



Tagungsband

62. Tagung

22. - 23. November 2011

VON MARKERGESTÜTZTER SELEKTION ZU
GENOMISCHER SELEKTION IN DER
PFLANZENZÜCHTUNG

WHEAT STRESS UND ROBUST WHEAT

Vereinigung der Pflanzzüchter
und Saatgutkaufleute Österreichs

62. Tagung

22.-23. November 2011

Von markergestützter Selektion
zu genomischer Selektion
in der Pflanzenzüchtung

Wheat stress und Robust Wheat

Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt
für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein

Impressum

Tagungsband der 62. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 22.-23. November 2011, Raumberg-Gumpenstein

Herausgeber

Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs
Wiener Straße 64, A-3100 St. Pölten
Tel.: +43 50 259 22500 Fax: +43 50 259 95 22500
email: office@saatgut-oesterreich.at; www.saatgut-oesterreich.at
Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt
für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein
Direktor Prof. Dr. Albert Sonnleitner und Dr. Anton Hausleitner

Für den Inhalt verantwortlich
die Autoren

Redaktion

Dr. Anton Brandstetter, Manuela Geppner
Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs

a.o.Univ.Prof. Dr. Heinrich Grausgruber
Universität für Bodenkultur Wien

Univ.Doiz. Dr. Karl Buchgraber
Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein (LFZ)

Layout

Brunhilde Egger
Institut für Pflanzenbau und Kulturlandschaft
Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein (LFZ)

Druck, Verlag und © 2012

Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein
(Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein)
Raumberg 38, A-8952 Irdning
Tel: (+43)03682/22451-0, Fax: (+43)03682/22451-210
email: office@raumberg-gumpenstein.at

ISBN-13:978-3-902559-74-6
ISSN: 2072-9596

Vorwort

Dr. Michael Gohn^{1*}

Sehr geehrte Damen und Herren!

Namens der Vereinigung darf ich Sie alle als Obmann sehr herzlich begrüßen und freu mich über Ihr Interesse an dieser unserer Tagung.

Wie üblich möchte ich mich sehr herzlich hier in Raumberg-Gumpenstein beim Hausherrn, Herrn Direktor Sonnleitner, für die Zurverfügungstellung der Räumlichkeiten bedanken und auch gleich den Wunsch aussprechen, dass wir dieses Gastrecht auch in den nächsten Jahren ausüben dürfen. Ebenso bedanke ich mich einerseits für uns als Veranstalter als auch im Namen aller Teilnehmer bei Dr. Karl Buchgraber, der wie immer Rahmenprogramm, gemeinsamen Abend und Organisation vor Ort in seine Hände genommen hat.

Das wissenschaftliche Programm hat Prof. Heinrich Grausgruber wie schon seit einigen Jahren erstellt und die Vortragenden eingeladen.

Wir haben für dieses Jahr zwei uns wichtig erscheinende Themenblöcke aufgestellt, einerseits den Weg der markergestützten Selektion zur genomischen Selektion, und andererseits das Thema „Wheat Stress and Robust Wheat“.

Die markergestützte Selektion wird ja bereits für einige Pflanzencharakteristiken angewandt, wie z.B. Fusariumresistenz bei Weizen, und da sind wir sehr interessiert, was es Neues auf diesem Gebiet gibt und wie sich dieses Verfahren weiter entwickelt hat.

Wheat Stress / Robust Wheat andererseits ist, wie es derzeit wahrgenommen wird, ein Dauerthema anlässlich der sich abzeichnenden Klimaveränderung. Hier ist die Pflanzenzüchtung wirklich gefordert, klimaangepasste Sorten herauszubringen, da der Nahrungsmittelbedarf angesichts der stetig steigenden Weltbevölkerung kontinuierlich mitwächst.

In diesem Sinne wünsche ich Ihnen allen eine erfolgreiche Tagung mit vielen fruchtbringenden Gesprächen und eröffne somit diese 62. Jahrestagung.

¹ Obmann der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, Wiener Straße 64, A-3100 ST. PÖLTEN

* Ansprechpartner: Michael GOHN, michael.gohn@mauthner.co.at

Inhaltsverzeichnis

Genomic Selection: Promise, experience, expectation	1
Johann Sölkner, Birgit Gredler, Hermann Schwarzenbacher, Johann Tanzler, Anamarija Frkonja, Gabor Meszaros and Christa Egger-Danner	
Genom-basierte Vorhersage der Testkreuzungsleistung bei Mais	3
Theresa Albrecht und Chris-Carolin Schön	
Advanced back-cross QTL mapping of resistance to Fusarium head blight derived from <i>Triticum macha</i> (Georgian spelt wheat)	7
Maria Buerstmayr, Marc Lemmens, Barbara Steiner and Hermann Buerstmayr	
Assoziationskartierung in einer Hybridroggen-Zuchtpopulation	9
Dörthe Musmann, Eike Lornsen, Gisela Jansen, Matthias Enders, Barbara Kusterer, Hans-Ulrich Jürgens, Frank Ordon, Andrzej Kilian, Franz-Joachim Fromme, Peter Wehling und Bernd Hackauf	
Mapping and marker development for breeding of oilseed rape with resistance to <i>Verticillium longisporum</i>	19
Christian Obermeier, Muhammed Ali Hossain, Rod Snowdon, Jessica Knüfer, Andreas von Tiedemann and Wolfgang Friedt	
Development of molecular markers using high-throughput sequencing technology	21
Friederike Trognitz and Bodo Trognitz	
Transcriptomic characterization of <i>Fusarium</i> resistance QTL <i>Fhb1</i> and <i>Qfhs-ifa.5A</i> in wheat near-isogenic lines	25
Wolfgang Schweiger, Barbara Steiner, David P. Kreil, Franz Berthiller, Marc Lemmens, Gary J. Muehlbauer and Hermann Buerstmayr	
Entwicklung eines auf Mikrosatelliten basierenden Nachweissystems zur Differenzierung von Gerstensorten	27
Jun Wang, Verena Peterseil, Helmut K. Mayer und Rupert Hohegger	
GMO Screening in Saatgut - 8 aus 53?	31
Andreas Firzinger	
Trockentoleranz in Gerste - Ansätze zur Phänotypisierung	35
Henrik Schumann, Anne Reinders, Alexandra Bothe, Melanie Herker, Stefan Paulus und Jens Léon	
Phänotypisierung mittels Nahinfrarot-Spektroskopie am Beispiel Gelbpigmentgehalt des Weizens	37
Susanne Kirchmaier, Johann Vollmann, Negash Geleta Ayana, Susanne Siebenhandl-Ehn, Michael Prückler und Heinrich Grausgruber	
Greenhouse test for drought tolerance of the CORNET wheat variety set	43
János Pauk, Csaba Lantos, Róbert Mihály, Clemens Flamm, Maren Livaja, László Cseuz, Michael Schmolke and Szabolcs Ruthner	
Influence of different water supply on yield parameters and quality of winter wheat	49
Clemens Flamm, Caroline Engel, Elisabeth Zechner, Maren Livaja, Michael Schmolke and János Pauk	
Characterization of a segregating winter wheat population regarding abiotic stress	55
Maren Livaja, Clemens Flamm, János Pauk and Michael Schmolke	
Variabilität und Beziehungen von Samendormanz, Auswuchs und Fallzahl in einem Sortiment europäischer Winterweizen	61
Michael Oberforster, Andreas Ratzenböck, Manfred Werteker, Anton Neumayer, Elisabeth Zechner und Lorenz Hartl	
Genetische Analyse des Merkmals Fallzahl in europäischen Winterweizen	69
Volker Mohler, Günther Schweizer und Lorenz Hartl	
Warum sind Steinbrand und Zwergsteinbrand derzeit nicht nur im ökologischen Getreidebau ein Problem?	73
Benno Voit, Markus Dressler und Berta Killermann	
Erkennung technologischer und allergener Eigenschaften an Hand von Proteinspektren in Getreide	77
Atousa Motie und Manfred Werteker	
Genetic resources of hulled wheat species in Czech organic farming	81
Petr Konvalina, Ivana Capouchová and Zdeněk Stehno	

Purpurweizen - geht's noch bunter?	
Steigerung des Anthocyangehaltes in Blaukorn-×Purpurweizen Kreuzungen	87
Johanna Baron, Susanne Siebenhandl-Ehn, Sharifah Nabihah Binti Syed Jaafar, Stefan Böhmendorfer, Thomas Rosenau und Heinrich Grausgruber	
Beispiele zur genetischen Variabilität bei diploiden Artkreuzungen zwischen Deutschem Weidelgras (<i>Lolium perenne</i>) und Wiesenschwingel (<i>Festuca pratensis</i>)	91
Tatjana Lunenberg und Stephan Hartmann	
Root characteristics of durum wheat and wheat relatives	101
Alireza Nakhforoosh, Doris Schuhwerk, Gernot Bodner, Stefan Kutschka and Heinrich Grausgruber	
Biomass production of white mustard (<i>Sinapis alba</i> L.) varieties in relation to the root system size	105
Martin Hajzler, Jana Klimešová and Tomáš Středa	
Testing of pre-harvest sprouting of wheat and triticale at the breeding station Uhretice, Selgen Corp., Czech Republic	109
Irena Bizova, Martin Hromadko and Karel Svec	
Süßlupinen als alternative Eiweißfrüchte für Biobetriebe?	111
Waltraud Hein und Hermann Waschl	
Erfassung der genetischen Variabilität agronomischer Eigenschaften von Blauer Lupine	115
Anne-Kathrin Klamroth, Regine Dieterich, Bernhard Saal, Inge Broer und Jana Huckauf	
Einfluss von Keimfähigkeit und Triebkraft auf den Feldaufgang und Ertrag bei Sojabohnen	117
Benno Voit, Georg Salzeder, Alois Aigner und Berta Killermann	
Entwicklung einer <i>in vitro</i> Vermehrungsmethode für Gelben Enzian (<i>Gentiana lutea</i> L.)	119
Maria Granilshchikova und Elisabeth Kopper	
Marker assisted breeding for improving Fusarium head blight resistance in wheat	123
Hermann Buerstmayr, Aziz Salameh, Maria Buerstmayr, Barbara Steiner, Anton Neumayer and Marc Lemmens	
Molecular mapping of resistance to Fusarium head blight in tetraploid wheat	125
Karin Huber, Abdallah Issam Alimari, Johannes Heckmann, Maria Buerstmayr, Marc Lemmens, Barbara Steiner and Hermann Buerstmayr	
Expression-QTL mapping in wheat to identify genes involved in resistance to <i>Fusarium graminearum</i>	127
Mina Samad-Zamini, Wolfgang Schweiger, Erik Sam, Gerald Siegwart, Barbara Steiner, Marc Lemmens and Hermann Buerstmayr	
Reconstruction and cloning of wheat UDP-glucosyltransferases with the putative ability to inactivate the <i>Fusarium</i> toxin deoxynivalenol	129
Andreas Teutschl, Wolfgang Schweiger, Gerald Siegwart, Erik Sam, Barbara Steiner, Hermann Buerstmayr, Marc Lemmens and Gerhard Adam	
QTL mapping of adult plant leaf rust and stripe rust resistance derived from the Austrian winter wheat cultivar Capo	131
Lydia Matiasch, Maria Buerstmayr, Katharina Herzog, Ján Kraic, Valéria Šudyová, Svetlana Šliková, Franziska Löschenberger, Marion Marn, Julia Lafferty, Marianna Ittu, Gyula Vida, Fabio Mascher, Lorenz Hartl, Kerstin Flath and Hermann Buerstmayr	

Genomic Selection: Promise, experience, expectation

Johann Sölkner¹, Birgit Gredler¹, Hermann Schwarzenbacher², Johann Tanzler³,
Anamarija Frkonja¹, Gabor Meszaros¹ and Christa Egger-Danner²

Abstract

In February 2008 a project on genomic selection for Fleckvieh in Austria was started. The goals of the project were (i) the development of genomic evaluation procedures for Fleckvieh, (ii) the comparison of methods, (iii) check the utility of the technology to improve low heritability traits and (iii) the establishment of routine genomic selection including the logistics. Within the project 2000 bulls were genotyped using the Illumina 50k bead chip. Surprisingly, similar results were obtained when conceptionally very different methods (prune - bundle) were applied. As an outcome of the project first official

genomic breeding values for Fleckvieh were released in August 2011 and the new system is about to replace the traditional progeny testing system. Genomic selection proved to be efficient and is being implemented while the methodology is still not fully developed. In the meantime a new project commenced including also Pinzgauer, Tirol Grey and Brown Swiss.

Keywords

Animal breeding, Fleckvieh, genomic selection, Simmental

¹ Department für Nachhaltige Agrarsysteme, Institut für Nutztierwissenschaften, Gregor Mendel Straße 33, A-1180 WIEN

² ZuchtData EDV-Dienstleistungen GmbH, Dresdner Straße 89/19, A-1200 WIEN

³ Arbeitsgemeinschaft österreichischer Fleckviehzüchter, Pater Werner Deibl Straße 4, A-3910 ZWETTL

* Ansprechpartner: Johann SÖLKNER, johann.soelkner@boku.ac.at

Genom-basierte Vorhersage der Testkreuzungsleistung bei Mais Genome-based prediction of testcross performance in maize

Theresa Albrecht und Chris-Carolin Schön^{1*}

Abstract

Most traits of agronomic importance follow a quantitative distribution. The assessment of these quantitative traits in performance tests is time and resource consuming. Thus, prediction of the genetic potential of individuals based on their DNA profile is highly desirable. This study comprised 1380 doubled haploid (DH) lines genotyped with 1152 single nucleotide polymorphism (SNP) markers. A subset of 759 DH lines was genotyped with additional 56110 SNP markers. Testcross progenies of the DH lines were phenotyped for the two traits grain yield and grain dry matter content in seven environments. We used best linear unbiased prediction and stratified 5-fold cross-validation to compare the performance of different statistical models with respect to genome-based prediction of testcross performance in maize. Models including genomic information outperformed the pedigree-based prediction model. Average predictive abilities were high for grain yield when the prediction was performed within families (0.66-0.68). Predictions across distantly related families lead to a decrease in predictive abilities (0.43-0.44). Predictive abilities were still relatively high when the population size was halved. For grain yield, an increase in predictive ability from 0.59 to 0.62 was achieved when the number of markers was increased from 1152 to 56110. Our results look promising for the implementation of genome-based prediction into breeding programs.

Keywords

Genome-based prediction, genomic selection, testcross performance, *Zea mays*

Einleitung

In der Pflanzenzüchtung basiert die genetische Verbesserung komplexer Merkmale weitestgehend auf der phänotypischen Evaluierung einer großen Zahl von Selektionskandidaten in ressourcenintensiven, mehrortigen und mehrjährigen Feldversuchen. Die Anwendung der von MEUWISSEN et al. (2001) für die Rinderzucht vorgeschlagenen Methode der genomischen Selektion könnte jedoch dazu führen, dass neben der im Feld gemessenen phänotypischen Leistung auch der genomische Wert eines Individuums in der Selektion Berücksichtigung finden wird.

Methodisch ist die genomische Selektion als eine Weiterentwicklung der marker-gestützten Selektion zu sehen. Die

dichte Abdeckung des Genoms mit molekularen Markern, wie den Einzelbasenmutationen (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs), erlaubt den genetischen Wert eines Individuums auf der Basis des Markerprofils des Gesamtgenoms zu schätzen. Während in der klassischen Kopplungs- oder Assoziationskartierung einzelne Genomregionen mit signifikantem Effekt auf das Zielmerkmal identifiziert und zur Selektion genutzt werden, ist es durch eine massive Erhöhung der Markerdichte möglich, über Kopplungsungleichgewichte (engl. *linkage disequilibrium*; LD) alle Gene, die für ein quantitatives Merkmal kodieren (engl. *quantitative trait loci*; QTL), zu erfassen und in die Vorhersage des genetischen Werts einzubeziehen.

Zunächst müssen an einer möglichst großen Referenzpopulation sowohl genotypische als auch phänotypische Daten erhoben werden. Mittels statistischer Modelle werden auf der Basis dieser Daten Vorhersagemodelle entwickelt, die dazu dienen, die Leistung der nicht phänotypisierten Selektionskandidaten vorherzusagen und die besten Kandidaten auf der Basis ihres DNA Profils zu selektieren.

In der Tierzüchtung finden diese Methoden bereits breite Anwendung bei der genomischen Zuchtwertschätzung, z.B. von ungeprüften Bullen (VANRADEN et al. 2009) und erste experimentelle Studien zeigen, dass die genom-basierte Leistungsvorhersage auch für die Pflanzenzüchtung von Bedeutung sein kann (ALBRECHT et al. 2011, HEFFNER et al. 2011). Zur Abschätzung des züchterischen Potentials der genom-basierten Leistungsvorhersage muss ihre relative Effizienz im Vergleich zur phänotypischen Selektion bewertet werden. Eine wichtige Komponente ist hierbei die Genauigkeit der genomischen Vorhersage, d.h. die Höhe der Korrelation des vorhergesagten mit dem wahren genetischen Wert der Selektionskandidaten. In der Hybridmaiszüchtung steht dabei vor allem die Genauigkeit der Vorhersage der Testkreuzungsleistung von Inzuchtlinien im Mittelpunkt der Betrachtung.

In dieser Studie zeigen wir an einem experimentellen Datensatz verschiedene Methoden und Ergebnisse zur genom-basierten Vorhersage der Testkreuzungsleistung bei Mais. Mittels Kreuzvalidierung bestimmen wir (1) die Vorhersagegenauigkeit verschiedener Modelle, basierend auf der erwarteten oder realisierten Verwandtschaft zwischen DH-Linien, (2) die Bedeutung des Verwandtschaftsgrades für die Vorhersagegenauigkeit, (3) den Einfluss der Populationsgröße auf die Vorhersagegenauigkeit und (4) das Potential der Vorhersage basierend auf dem MaizeSNP50 BeadChip von Illumina (GANAL et al. 2011).

¹ Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, TU München, Emil-Ramann-Straße 4, D-85354 FREISING

* Ansprechpartner: Chris-Carolin SCHÖN, chris.schoen@wzw.tum.de

Material und Methoden

Die vorliegende Studie an Mais (*Zea mays* L.) umfasst insgesamt 1380 doppelhaploide (DH) Linien aus 36 Kreuzungen mit je 14 bis 60 Nachkommen. Die Abstammung der DH-Linien kann bis zu drei Generationen zurückverfolgt werden (ALBRECHT et al. 2011). Die Phänotypisierung fand in Form von Testkreuzungen an sieben europäischen Standorten statt. In diesen Körnermaisversuchen wurden zwei Merkmale, Korntrockenmasseertrag (KE, dt·ha⁻¹) und Korntrockenmassegehalt (KTMG, %), erfasst. An jedem Standort bestand das experimentelle Design aus 15 unwiederholten 10×10 Gitteranlagen jeweils bestehend aus 92 DH-Linien und vier wiederholten Standards. Adjustierte Mittelwerte am Einzelort wurden mittels der wiederholten Standards berechnet.

Für die Genotypisierung der 1380 DH-Linien wurde ein VeraCode-Assay mit 1152 SNPs verwendet. Drei DH-Linien mussten aufgrund nicht ausreichender Qualität der genotypischen Daten verworfen werden. Für die weiteren Analysen wurden 732 SNPs mit weniger als 10% fehlenden Werten und einer Frequenz des weniger häufigen Allels (engl. *minor allele frequency*, MAF) größer 1% verwendet.

Ein Teil der DH-Linien ($N=759$) wurde zusätzlich mit dem MaizeSNP50 BeadChip von Illumina (GANAL et al. 2011) mit insgesamt 56110 SNP-Markern genotypisiert. Nach einer Qualitätskontrolle (GenTrain-Score >0,9; MAF >0,01; fehlende Werte <0,10) gingen 20742 SNP-Marker in die weiteren Analysen ein. Die 20742 SNP-Marker sind gleichmäßig über alle zehn Chromosomen des Maisgenoms verteilt und haben einen durchschnittlichen Abstand von 0,11 Mb. Fehlende Werte wurden anhand der Familienstruktur ersetzt. Eine Übersicht über die in dieser Studie verwendeten Datensätze ist in *Tabelle 1* gegeben.

Tabelle 1: Anzahl DH-Linien und SNP-Marker für drei in dieser Studie verwendete Datensätze

Table 1: Number of DH lines and SNP markers for three data sets used in this study

Datensatz	Anzahl DHs (N)	Anzahl SNPs (M)
VC1	1377	732
VC2	759	654
50k	759	20742

Vorhersage der Testkreuzungsleistung

Die Vorhersage der Testkreuzungsleistung der DH-Linien wurde mit linearen gemischten Modellen durchgeführt, wobei die zufälligen Effekte der Genotypen sogenannte BLUPs (engl. *best linear unbiased predictors*; HENDERSON 1984) sind. Die Vorhersagegenauigkeit folgender drei Modelle, die sich in der Modellierung der zufälligen Effekte unterscheiden, wurde untersucht:

$$\begin{aligned} \text{PBLUP} & \quad \mathbf{y} = \boldsymbol{\mu} + \mathbf{Zt} + \mathbf{e} \\ \text{GBLUP} & \quad \mathbf{y} = \boldsymbol{\mu} + \mathbf{Zs} + \mathbf{e} \\ \text{P+GBLUP} & \quad \mathbf{y} = \boldsymbol{\mu} + \mathbf{Zt} + \mathbf{Zs} + \mathbf{e} \end{aligned}$$

In allen drei Modellen enthält der Vektor \mathbf{y} die N adjustierten Mittelwerte aus der Auswertung der phänotypischen Daten über die sieben Standorte. In allen drei Modellen steht der Vektor $\boldsymbol{\mu}$ für das Gesamtmittel und der Residuenvektor \mathbf{e}

folgt einer Normalverteilung mit $\mathbf{e} \sim N(0, \mathbf{I}\sigma^2)$. Die Designmatrix \mathbf{Z} ordnet die Phänotypen den zufälligen Effekten zu. Die drei Modelle unterscheiden sich durch die den zufälligen Effekten zugrunde liegende Varianz-Kovarianz-Struktur. Im Modell PBLUP (Pedigree-BLUP) ist der Vektor \mathbf{t} normalverteilt mit $\mathbf{t} \sim N(0, \mathbf{K}\sigma_t^2)$. Die Varianz-Kovarianz-Matrix \mathbf{K} entspricht hier der Verwandtschaftsmatrix basierend auf drei Generationen Abstammungsinformation und σ_t^2 ist die für das Modell PBLUP spezifische genetische Varianz der Testkreuzungen.

Im GBLUP (Genomic-BLUP) ist der Vektor \mathbf{s} ebenfalls normalverteilt mit $\mathbf{s} \sim N(0, \mathbf{S}\sigma_s^2)$ und σ_s^2 ist die für das Modell GBLUP spezifische Varianz der Testkreuzungen. Die marker-basierte Verwandtschaftsmatrix \mathbf{S} wird über den Simple-Matching-Koeffizienten (SNEATH and SOKAL 1973) berechnet, der für alle möglichen paarweisen Linienkombinationen den Anteil übereinstimmender Marker-genotypen relativ zur Gesamtzahl der Marker quantifiziert. Dabei ergibt sich für die Matrix \mathbf{S}_{SM} mit paarweisen Simple-Matching-Koeffizienten folgende Formel:

$$\mathbf{S}_{SM} = \frac{(\mathbf{W} - \mathbf{J}_{N \times M})(\mathbf{W} - \mathbf{J}_{N \times M})' + M\mathbf{J}_{N \times N}}{2M}$$

wobei die Matrix \mathbf{W} die Marker-Genotypen der DHs enthält (0 oder 2 Kopien des selteneren Alleles), $\mathbf{J}_{N \times M}$ und $\mathbf{J}_{N \times N}$ Matrizen mit Einsen als Elemente und den Dimensionen $N \times M$ und $N \times N$ sind und M die Anzahl der Marker ist. Um daraus die Matrix \mathbf{S} , die im Modell GBLUP die Varianz-Kovarianz-Struktur der zufälligen Effekte beschreibt, zu erhalten, wird jedes Element der Matrix mit dem Minimum s_{\min} der Matrix \mathbf{S}_{SM} korrigiert und \mathbf{S} ergibt sich als:

$$\mathbf{S} = \frac{(\mathbf{W} - \mathbf{J}_{N \times M})(\mathbf{W} - \mathbf{J}_{N \times M})' + M\mathbf{J}_{N \times N} - 2Ms_{\min}\mathbf{J}_{N \times N}}{2M(1 - s_{\min})}$$

Im Modell P+GBLUP wird sowohl die abstammungsbasierte als auch die marker-basierte Verwandtschaft berücksichtigt.

Kreuzvalidierung

Die Kreuzvalidierung (engl. *cross-validation*; CV) ist eine Methode zur Bestimmung der Vorhersagegenauigkeit statistischer Modelle und zum Vergleich verschiedener Modelle. Dabei werden die Daten zufällig auf k gleich große Teildatensätze aufgeteilt. Aus $k-1$ Teildatensätzen wird ein Trainingsdatensatz (engl. *estimation set*; ES) gebildet, anhand dessen das Vorhersagemodell entwickelt wird. Für den verbleibenden Teildatensatz (engl. *test set*; TS) wird die Testkreuzungsleistung der DH-Linien vorhergesagt. Anhand der Korrelation zwischen der vorhergesagten Testkreuzungsleistung der DH-Linien im TS und ihrer tatsächlich beobachteten Leistung kann die Vorhersagegenauigkeit des Modells bewertet werden.

In dieser Studie haben wir eine 5-fach CV unter Berücksichtigung der Verwandtschaftsstruktur der DH-Linien durchgeführt (LEGARRA et al. 2008). Dabei wird der Datensatz in fünf gleich große Teildatensätze geteilt. Jeder der fünf Teildatensätze bildet ein TS mit zugehörigem Trainingsdatensatz bestehend aus den anderen vier Teildatensätzen. Wird die Aufteilung der DH-Linien auf die Teildatensätze zehnmal neu randomisiert, ergeben sich insgesamt 50 CV-Läufe. Um die Abhängigkeit der Vorhersagegenauigkeit vom Grad der Verwandtschaft zwischen ES und TS zu untersuchen, wurde

bei der Aufteilung der DH-Linien auf die Teildatensätze die Familienstruktur berücksichtigt. Wird jede Familie in fünf Teile geteilt (engl. *CV within*; CV-W), ist eine engere Verwandtschaft zwischen ES und TS zu erwarten, als wenn ganze Familien entweder dem ES oder dem TS zugeteilt werden (engl. *CV across*; CV-A).

Um den Effekt der Populationsgröße auf die Vorhersagegenauigkeit zu ermitteln, wurde der Datensatz VC1 in zwei, vier und acht Teildatensätze geteilt. Durch wiederholte, neu randomisierte Zuordnung der DH-Linien zu den Teildatensätzen entstanden für $N=688$, 344 und 172 jeweils 32 unterschiedliche Teildatensätze. In jedem dieser Teildatensätze wurde die Vorhersagegenauigkeit mittels 5-fach CV mit zufälliger Aufteilung der DH-Linien auf ES und TS für die drei beschriebenen Modelle bewertet.

Ergebnisse und Diskussion

Die Genauigkeiten der Vorhersage der Testkreuzungsleistung für die beiden Merkmale Kornertrag und Korntrockenmassegehalt sind für die VC1-Daten mit 1377 DH-Linien und 732 SNPs in *Tabelle 2* dargestellt. Die Modelle, die genomische Information nutzen (GBLUP und P+GBLUP), erzielten signifikant höhere Vorhersagegenauigkeiten als das PBLUP Modell. Für Kornertrag lag die Vorhersagegenauigkeit für GBLUP bei 0,66, wenn bei der Kreuzvalidierung die Aufteilung in ES und TS innerhalb der Familien vorgenommen wurde (CV-W) und bei 0,44 wenn Familien entweder dem ES oder dem TS zugeteilt wurden (CV-A). Bei PBLUP wurde für CV-W eine Korrelation zwischen vorhergesagter und beobachteter Testkreuzungsleistung von 0,51 erreicht. Wie erwartet war die Vorhersagegenauigkeit für PBLUP und CV-A mit 0,11 sehr gering. Für Korntrockenmassegehalt lagen die Genauigkeiten insgesamt höher als für Kornertrag mit 0,72 für GBLUP in CV-W und 0,59 in CV-A.

Ein Grund für das bessere Abschneiden der marker-basierten Modelle liegt in der genaueren Vorhersage der Testkreuzungsleistung innerhalb von Familien. Alle Nachkommen einer Kreuzung erhalten basierend auf Stammbauminformationen denselben Abstammungskoeffizienten und somit kann mit PBLUP bei der Vorhersage der Testkreuzungsleistung nicht zwischen DH-Linien, die auf dieselbe Kreuzung zurückgehen, differenziert werden. Bei GBLUP hingegen wird die realisierte Verwandtschaft anhand der

Tabelle 2: Durchschnittliche Vorhersagegenauigkeit drei verschiedener Modelle für die Merkmale Kornertrag (KE) und Korntrockenmassegehalt (KTMG), basierend auf 50 Kreuzvalidierungen innerhalb (CV-W) und zwischen Familien (CV-A) des VC1 Datensatzes

Table 2: Average predictive abilities of three models for the traits grain dry matter yield (KE) and grain dry matter content (KTMG) evaluated with 50 cross-validation runs based on sampling within (CV-W) and across families (CV-A) of the VC1 data set

Modell	KE		KTMG	
	CV-W	CV-A	CV-W	CV-A
PBLUP	0,51	0,11	0,50	0,31
GBLUP	0,66	0,44	0,72	0,59
P+GBLUP	0,68	0,43	0,72	0,59

genom-weiten Markerdaten berechnet und somit kann bei der Leistungsvorhersage auch zwischen DH-Linien, die auf dieselbe Kreuzung zurückgehen, unterschieden werden. In *Abbildung 1* ist die vorhergesagte Testkreuzungsleistung für Kornertrag von 264 DH-Linien eines zufällig ausgewählten TS aus CV-W für die Modelle PBLUP und GBLUP gegen die aus dem Gesamtdatensatz geschätzte mittlere Familienleistung gezeigt. Während für PBLUP nur ein gemeinsamer Wert für die Testkreuzungsleistung aller DH-Linien einer Familie angegeben ist, differenziert GBLUP auch zwischen DH-Linien derselben Kreuzung.

Der Zusammenhang zwischen der Größe des Trainingsdatensatzes und der Vorhersagegenauigkeit für die drei Modelle ist in *Abbildung 2* dargestellt. Bei Halbierung des Datensatzes von 1377 DHs auf 688 DHs fällt die Vorhersagegenauigkeit aller Modelle leicht ab. Bei Reduktion der Populationsgröße von 344 auf 172 Linien fällt bei allen drei Modellen die Vorhersagegenauigkeit stark ab.

Die Erhöhung der Markerdichte von 654 SNPs (VC2, $N=759$) auf 20742 SNPs (50k, $N=759$) führte für beide

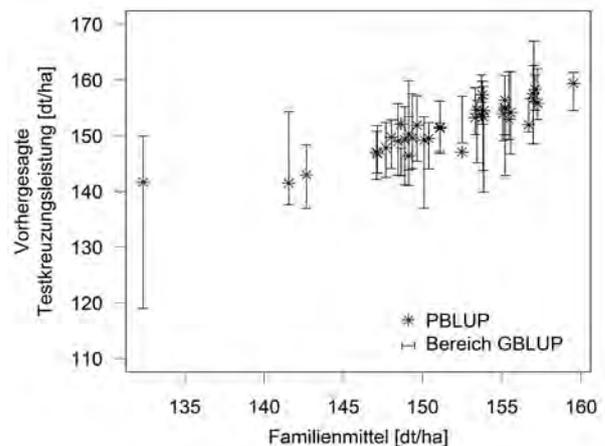


Abbildung 1: Vorhergesagte Testkreuzungsleistung mit PBLUP sowie der mit GBLUP vorhergesagte Wertebereich eines TS aus CV-W gegen das jeweilige Familienmittel für das Merkmal Kornertrag im Datensatz VC1

Figure 1: Predicted testcross performance of DH lines with PBLUP and range of predicted performance with GBLUP for one TS randomly chosen from CV-W plotted against the respective family mean for grain yield in the data set VC1

Merkmale zu einer signifikant höheren Vorhersagegenauigkeit (*Abbildung 3*). Für Kornertrag erhöhte sich die Vorhersagegenauigkeit von 0,59 auf 0,62 mit CV-W und von 0,35 auf 0,39 mit CV-A. Beim direkten Vergleich der mit GBLUP erzielten Vorhersagegenauigkeit der Datensätze VC1 und 50k wird jedoch erkennbar, dass die Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit durch mehr Marker den durch die geringere Populationsgröße entstandenen Verlust an Genauigkeit nicht kompensieren konnte.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studie sind ermutigend für die Implementierung der genom-basierten Leistungsvorhersage in Zuchtprogrammen bei Mais. Für die beiden Merkmale Kornertrag und Korntrockenmassegehalt konnten mit

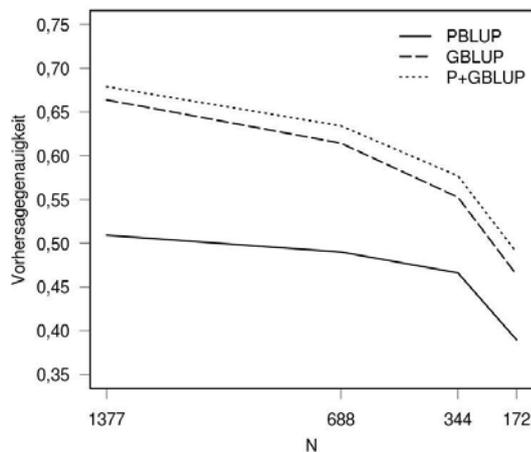


Abbildung 2: Vorhersagegenauigkeit für Kornertrag der Modelle PBLUP, GBLUP und P+GBLUP mit zufälliger Kreuzvalidierung in Abhängigkeit von der Populationsgröße N für den Datensatz VC1

Figure 2: Predictive ability for grain yield of models PBLUP, GBLUP and P+GBLUP derived from random cross-validation as a function of population size N for the data set VC1

marker-basierten Vorhersagemodellen und Kreuzvalidierung innerhalb Familien hohe Korrelationen zwischen vorhergesagter und beobachteter Testkreuzungsleistung erzielt werden. Jedoch hatte der Verwandtschaftsgrad zwischen den DH-Linien in der Trainingspopulation und den DH-Linien, deren Leistung vorhergesagt werden sollte, einen großen Einfluss auf die Vorhersagegenauigkeit. Auch die Populationsgröße wirkte sich deutlich auf die Vorhersagegenauigkeit der Modelle aus. Bis zu einer Größe von $N=688$ erzielte GBLUP jedoch immer noch gute Ergebnisse. Ein Anstieg der Vorhersagegenauigkeit konnte mit Zunahme der Markerdichte auf 20742 SNPs erreicht werden.

Um zu einer soliden Bewertung der relativen Effizienz der genom-basierten Vorhersage zu kommen, bedarf es weiterer experimenteller Ergebnisse zur Genauigkeit der Vorhersage über Materialgruppen, Jahre, Tester und Selektionszyklen. Es ist jedoch auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse zu erwarten, dass die marker-basierte Leistungsvorhersage bestehende, phänotyp-basierte Zuchtprogramme sinnvoll ergänzen kann.

Danksagung

Diese Studie wurde durchgeführt in enger Zusammenarbeit zwischen den Autoren und Hans-Jürgen Auinger, Malena Erbe, Carsten Knaak, Milena Ouzunova, Henner Simianer und Valentin Wimmer. Diese Studie wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) durch das AgroClustEr *Synbreed - Synergistische Pflanzen- und Tierzüchtung* (FKZ: 0315528A) gefördert.

Literatur

- ALBRECHT T, WIMMER V, AUINGER HJ, ERBE M, KNAAK C, OUZUNOVA M, SIMIANER H, SCHÖN CC. 2011: Genome-based prediction of testcross values in maize. *Theor Appl Genet* 123: 339-350.
- GANAL MW, DURSTEWITZ G, POLLEY A, BÉRARD A, BUCKLER ES, CHARCOSSET A, CLARKE JD, GRANER EM, HANSEN M,

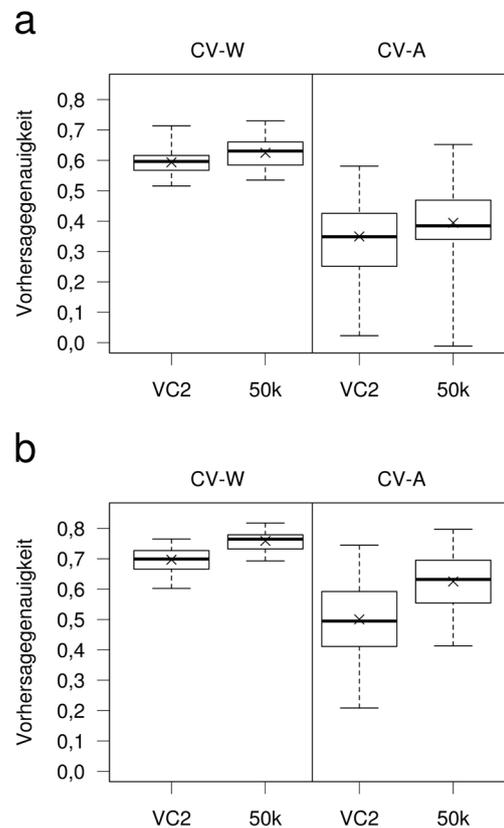


Abbildung 3: Vergleich der Vorhersagegenauigkeit von GBLUP für die Datensätze VC2 ($M=654$, $N=759$) und 50k ($M=20742$, $N=759$) mittels Kreuzvalidierung innerhalb (CV-W) und zwischen Familien (CV-A) für die Merkmale Kornertrag (a) und Korn trockenmassegehalt (b).

Figure 3: Comparison of the predictive ability of GBLUP with data sets VC2 ($M=654$, $N=759$) and 50k ($M=20742$, $N=759$) determined from cross-validation within (CV-W) and across families (CV-A) for grain yield (a) and grain dry matter content (b).

JOETS J, LE PASLIER MC, MCMULLEN MD, MONTALENT P, ROSE M, SCHÖN CC, SUN Q, WALTER H, MARTIN OC, FALQUE M. 2011: A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: Development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome. *PLoS One* 6(12): e28334. (DOI:10.1371/journal.pone.0028334)

HEFFNER ELJ, JANNINK JL, SORRELLS JL. 2011: Genomic selection accuracy using multifamily prediction models in a wheat breeding program. *Plant Genome* 4: 65-75.

HENDERSON CR. 1984: Applications of linear models in animal breeding. University of Guelph, Guelph.

LEGARRA A, ROBERT-GRANIE C, MANFREDI E, ELSSEN JM. 2008: Performance of genomic selection in mice. *Genetics* 180: 611-618.

MEUWISSEN THE, HAYES BJ, GODDARD ME. 2001: Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819-1829.

SNEATH PH, SOKAL RR. 1973: Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. Freeman, San Francisco, CA.

VANRADEN PM, TASSELL CV, WIGGANS GR, SONSTEGARD TS, SCHNABEL RD, TAYLOR JF, SCHENKEL FS. 2009: Invited review: reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *J Dairy Sci* 92: 16-24.

Advanced back-cross QTL mapping of resistance to Fusarium head blight derived from *Triticum macha* (Georgian spelt wheat)

Maria Buerstmayr^{1*}, Marc Lemmens, Barbara Steiner and Hermann Buerstmayr

Abstract

While many reports on genetic analysis of Fusarium head blight (FHB) resistance in bread wheat have been published during the past decade, only limited information is available on FHB resistance derived from wheat relatives. In this contribution we report the genetic analysis of FHB resistance derived from *Triticum macha* (Georgian spelt wheat). As the origin of *T. macha* is in the Caucasian region, it is supposed that its FHB resistance differs from other well-investigated resistance sources. In order to introduce valuable alleles from the landrace *T. macha* into a modern genetic background we adopted an advanced back-cross QTL mapping scheme (TANKSLEY and NELSON 1996). A backcross-derived recombinant-inbred line population of 321 BC₂F₃ lines was developed from a cross of *T. macha* with the Austrian winter wheat cultivar Furore. The population was evaluated for Fusarium resistance in seven field experiments during four seasons using artificial inoculations. In addition several plant morphological and developmental traits were evaluated, such as plant height, flowering date, and spike morphology. 300 lines of the population were genetically fingerprinted using SSR and AFLP markers. Map construction was done with an updated version of CarthaGène software (De GIVRY et al. 2005). For QTL mapping QGene software (NELSON 1997) was used.

The resulting linkage map covered 33 linkage groups with 560 markers. Five novel FHB-resistance QTL, all descending from *T. macha*, were found on four chromosomes (2A, 2B, 5A, 5B). These novel *T. macha* derived QTL appear valuable for broadening the genetic basis and diversity of FHB resistance in wheat. The major FHB resistance QTL at chromosome 5A is closely associated with the wild-type allele *q*, but it is currently unclear whether *q* has a pleiotropic effect on FHB resistance or is closely linked to a nearby resistance QTL. Although several QTL were associated with plant height, only the 2BL FHB resistance QTL co-located with a plant height QTL. Selected lines and markers linked to FHB resistance QTL from this study appear useful for practical resistance breeding because they carry novel QTL from the landrace *T. macha* in an already agronomically adapted background. In addition selected lines carrying *q* (spelt wheat ear type) could be useful as crossing partner for spelt wheat breeding. For further details see BUERSTMAYR et al. (2011).

Keywords

AB-QTL analysis, Fusarium head blight, morphological traits, spelt wheat, *Triticum macha*

Acknowledgments

We acknowledge funding of this work by FWF (Austrian Science Fund), project number: 17310-B05. We acknowledge Clare Nelson (Kansas State University, USA) for modifying the CarthaGène program to facilitate map construction directly from an advanced back-cross population.

References

BUERSTMAYR M, LEMMENS M, STEINER B, BUERSTMAYR H, 2011: Advanced backcross QTL mapping of resistance to Fusarium head blight and plant morphological traits in a *Triticum macha* × *T. aestivum* population. *Theor Appl Genet* 123: 293-306.

De GIVRY S, BOUCHEZ M, CHABRIER P, MILAN D, SCHIEX T, 2005: CARTHAGENE: multipopulation integrated genetic and radiated hybrid mapping. *Bioinformatics* 21: 1703-1704.

NELSON JC, 1997: QGENE: Software for marker-based genomic analysis and breeding. *Mol Breed* 3: 239-245.

TANKSLEY SD, NELSON JC, 1996: Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor Appl Genet* 92: 191-203.

Note: Previous results of this work were presented and published at the 11th European Fusarium Seminar, Radzikow, 20-24 Sep 2010, at the US Fusarium Head Blight Forum, Milwaukee, 7-9 Dec 2010, at the 9th Plant GEM, Istanbul, 4-7 May 2011 and the 21st ITMI Workshop, Mexico, 5-9 Sep 2011.

¹ Universität für Bodenkultur, Wien, IFA Tulln, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

* Ansprechpartner: Maria BUERSTMAYR, maria.buerstmayr@boku.ac.at

Assoziationskartierung in einer Hybridroggen-Zuchtpopulation Association mapping in a breeding population of hybrid rye

Dörthe Musmann¹, Eike Lornsen¹, Gisela Jansen², Matthias Enders³, Barbara Kusterer⁴, Hans-Ulrich Jürgens², Frank Ordon², Andrzej Kilian⁵, Franz-Joachim Fromme⁴, Peter Wehling¹ und Bernd Hackauf^{1*}

Abstract

Rye (*Secale cereale* L.) is mainly bred as a hybrid crop in Germany. We have exploited the potential of association mapping in a breeding population of hybrid rye to identify molecular markers for complex inherited traits. Testcross performance was evaluated in replicated field trials for plant height at nine and thousand grain weight at four locations in 2010. Whole genome profiling using Diversity Arrays Technology (DARt) markers allowed to characterize the structure of the genetic variation in experimental hybrids of this population and proved to be suitable for association mapping in the allogamous rye. We were able to identify markers associated with both traits at several significance levels in testcross progeny between elite inbred lines originating from two heterotic gene pools of rye. Sequence information on associated markers enabled a comparative genetic approach of QTL mapping and revealed, that the rice gene models orthologous to markers associated with QTL in rye are located in segments of the rice genome, which have previously been shown to carry QTL for the described traits as well. The discovered markers open new perspectives for the characterization and validation of QTL alleles and may contribute to strengthen the efficiency of hybrid rye breeding via marker assisted selection for superior alleles.

Keywords

Association mapping, candidate genes, DARt marker, hybrid rye, *Secale cereale*

Einleitung

Roggen (*Secale cereale* L.) ist die einzige fremdbefruchtende Getreideart. Mit der Etablierung der Hybridzüchtung konnten zuvor bestehende grundlegende methodische Schwierigkeiten bei der Auswahl und Vermehrung leistungsstarker Genotypen des anemogamen Roggens gelöst und ein signifikanter Zuchtfortschritt erzielt werden. Im Vergleich zu den besten Populationssorten zeigen Roggenhybriden eine um durchschnittlich 15-20% höhere Ertragsleistung (GEIGER und MIEDANER 2009). Unter den spezifischen

Produktionsbedingungen des ökologischen Landbaus, der unter anderem durch ein reduziertes Angebot an Stickstoff (N) gekennzeichnet ist, offenbaren Hybridsorten gegenüber Populationssorten sogar eine um bis zu 39% höhere Leistungsfähigkeit im Kornertrag (Abbildung 1). Neben dem größeren Ertragspotenzial von Hybriden kann diese Überlegenheit auf ihre ausgeprägtere Toleranz gegenüber abiotischem Stress wie Trockenheit oder niedriger N-Verfügbarkeit zurückgeführt werden (TOLLENAAR und LEE 2006). Die effiziente Nutzung von Stickstoff zählt zu den spezifischen Aspekten einer nachhaltigen Landwirtschaft (SPIERTZ 2010). Hybridzüchtung bei Roggen hält damit nicht nur eine traditionelle Fruchtart in unserer technisierten und hochgradig spezialisierten Landwirtschaft konkurrenzfähig, sondern kann darüber hinaus dazu beitragen, nachhaltige Lösungen zur Verbesserung der Stickstoffbilanz zu finden.

Derzeit entfallen 60% der Vermehrungsfläche von Roggen auf Hybridsorten (BUNDESSORTENAMT 2010). In Bezug auf die verschiedenen Nutzungsrichtungen des Roggens als Brot- und Futtergetreide sowie als nachwachsender Rohstoff für die Bioenergieerzeugung eröffnet die Hybridzüchtung die Möglichkeit, durch die gezielte Kombination vorselektierter Inzuchtlinien neue Hybridsorten mit spezifischen Qualitätsprofilen zu entwickeln. Der Qualitätszüchtung bei Roggen wird eine steigende Bedeutung beigemessen (MIEDANER und HÜBNER 2011).

Hybridzüchtung beruht auf der Identifizierung heterotischer Muster zwischen genetisch divergenten Genpools. Das allgemein in der Hybridroggenzüchtung eingesetzte heterotische Muster ist das Petkus×Carsten-Muster (GEIGER und MIEDANER 2009). Eine zytoplasmatisch bedingte männliche Sterilität (*cytoplasmic male sterility*, CMS) wird auf der Saaterterseite als genetischer Mechanismus der Befruchtungslenkung zur großflächigen Erzeugung von Kreuzungssaatgut genutzt, wobei das Pampa-Zytoplasma (GEIGER und SCHNELL 1970) dominiert (BUNDESSORTENAMT 2010). Kommerzielle Roggen-Hybriden sind ein Produkt aus CMS-Einfachkreuzungen als Saatertern und Restorer-Synthetiks als Polleneltern (GEIGER und MIEDANER 2009). Die Identifizierung von Kreuzungsnachkommen mit überragender Ertragsleistung ist die zentrale Aufgabe in

¹ Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, Rudolf-Schick-Platz 3a, D-18190 GROß LÜSEWITZ

² Julius Kühn-Institut, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Rudolf-Schick-Platz 3, D-18190 GROß LÜSEWITZ

³ Julius Kühn-Institut, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Erwin-Baur-Straße 27, D-06484 QUEDLINBURG

⁴ HYBRO Saatzeit GmbH & Co. KG, Kleptow 53, D-17291 SCHENKENBERG

⁵ Diversity Arrays Technology P/L, 1 Wilf Crane Crescent, Yarralumla, Canberra, ACT, 2600, Australia

* Ansprechpartner: Bernd HACKAUF, bernd.hackauf@jki.bund.de

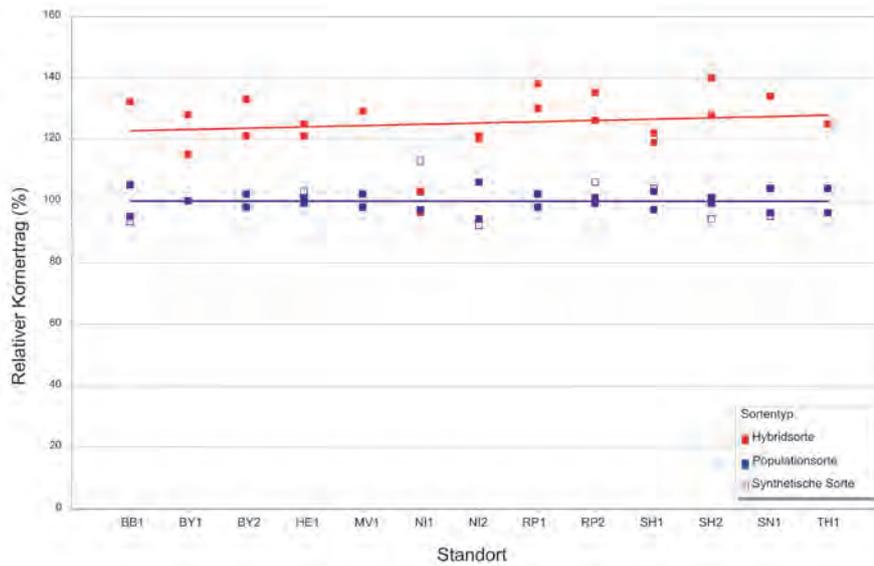


Abbildung 1: Relative Körnerträge von Winterroggen (in % der Verrechnungssorten) unter Bedingungen des ökologischen Landbaus auf 13 Standorten der Landessortenversuche 2008 (BB: Brandenburg; BY: Bayern; HE: Hessen; MV: Mecklenburg-Vorpommern; NI: Niedersachsen; RP: Rheinland-Pfalz; SH: Schleswig-Holstein; SN: Sachsen; TH: Thüringen) (nach MÜCKE und MEYERCORDT 2009)

Figure 1: Relative grain yields of winter rye (% relative to the mean of check varieties) grown under organic farming in 13 different locations of the German regional state trials 2008 (BB: Brandenburg; BY: Bavaria; HE: Hesse; MV: Mecklenburg-Vorpommern; NI: Lower Saxony; RP: Rhineland-Palatinate; SH: Schleswig-Holstein; SN: Saxony; TH: Thuringia) (according to MÜCKE and MEYERCORDT 2009)

kommerziellen Hybridzüchtungsprogrammen. Aus Zeit- und Kostengründen kann jährlich jedoch nur ein begrenzter Satz aller möglichen Experimentalhybriden aus vorgetesteten Linien in umfassenden Feldversuchen geprüft werden.

Die Effizienz von Hybridzüchtungsprogrammen kann durch den Einsatz molekularer Marker zur Vorhersage der Hybridleistung erhöht werden (VUYLSTEKE et al. 2000, YU et al. 2005, SCHRAG et al. 2006, MAENHOUT et al. 2009, FRISCH et al. 2010). Voraussetzung hierfür sind Kenntnisse über Marker, welche für die Ausprägung von züchterisch relevanten, quantitativ vererbten Merkmalen (*quantitative trait loci*, QTL) mitbestimmend sind. Für den Roggen sind bislang nur wenige derartige Marker-Merkmalbeziehungen beschrieben (BÖRNER et al. 1999, 2000; MASOJĆ und MILCZARSKI 2005, FALKE et al. 2009). Diese QTL-Studien wurden an Kartierungspopulationen aus biparentalen Kreuzungen (F₂, BC₁, RIL) durchgeführt. Die Effekte der dabei untersuchten zwei Allele auf die Merkmalsausprägung bedürfen daher der Validierung an den Elitelinien eines Zuchtprogramms. Die auf Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) beruhende Assoziationskartierung stellt einen alternativen Ansatz zur Kartierung von QTL dar. Sie bietet den Vorteil, dass sie direkt an Elitezuchtmaterial durchgeführt und die gewonnenen Erkenntnisse unmittelbar für die kommerzielle Sortenentwicklung genutzt werden können. Darüber hinaus ermöglichen Assoziationsstudien, eine potenziell große Zahl an Allelen je Genort zu evaluieren. Das niedrige LD im Roggen (LI et al. 2011a) verspricht in genomweiten Untersuchungen eine hohe genetische Auflösung. Allerdings kann diese aufgrund der Größe des Roggen-genoms von ca. 8,1 Gb nur über einen erheblichen Genotypisierungsaufwand erreicht werden. Insbesondere

microarray-basierte Markertechnologien besitzen durch die multiparallele Analyse einer großen Zahl an Genorten, eines hohen Polymorphiegrades sowie einer sehr guten Reproduzierbarkeit großes Potenzial für eine umfassende Erstellung von DNA-Fingerabdrücken bei Pflanzen. Microarray-basierte Markertechnologien stehen seit kurzem als Diversity Arrays Technology (DArT) (BOLIBOK-BRAGOSZEWSKA et al. 2009) sowie als Rye5K-SNP-Genotypisierungsarray (HASENEYER et al. 2011) auch für den Roggen zur Verfügung. Die DArT-Markertechnologie wurde bei Weizen und Gerste für genomweite Assoziationsstudien genutzt (CROSSA et al. 2007, RAMAN et al. 2010, NEUMANN et al. 2011, MATTHIES et al. 2012). Alternativ zu genomweiten Studien ermöglicht die Analyse von Kandidatengenomen, deren potenzielle Bedeutung für die Ausprägung komplex vererbter Merkmale zu studieren. Dieser Ansatz ist kürzlich erstmals erfolgreich bei Roggen für das Merkmal Frosttoleranz beschrieben worden (LI et al. 2011b).

Die vorliegende Studie hat zum Ziel, das Potenzial von DArT-Markern für eine genomweite Assoziationskartierung bei Roggen zu untersuchen. Wir beschreiben die Identifizierung molekularer Marker für komplex vererbte Merkmale mittels Assoziationskartierung in der Zuchtpopulation eines Hybridroggenzüchtungsprogramms. Darüber hinaus berichten wir über einen Ansatz der vergleichenden Genkartierung zwischen Roggen- und Reis-QTL für ein agronomisches und ein Qualitätsmerkmal.

Material und Methoden

Das Untersuchungsmaterial stammt aus der Zuchtpopulation der HYBRO Saatzeit und umfasst 102 Saatelterlinien

und 14 Pollenelterlinien. Die Leistungsprüfung von 197 Einfachkreuzungen zwischen diesen Saat- und Pollenelterlinien erfolgte 2010 an 9 Versuchsstandorten der HYBRO Saatzucht in Niedersachsen, Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg sowie in Polen als unvollständige Blockanlage (α -Design) in 5m² Parzellen und 2 Wiederholungen je Prüfglied. Das Merkmal Wuchshöhe (WUH) wurde in 9 Umwelten und der Qualitätsparameter Tausendkornmasse (TKG) in 4 Umwelten erfasst. Die phänotypischen Daten wurden mit Hilfe der Statistik-Software R 2.14.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2011) analysiert. Die Voraussetzung der Varianzhomogenität wurde mittels Levene-Test überprüft. Für die molekularen Analysen wurde genomische DNA aus jungen Blättern der Inzuchtlinien wie früher beschrieben (HACKAUF und WEHLING 2002) isoliert. Die 116 Genotypen wurden an 51 Mikrosatelliten-Loci auf einem ABI 3130x1 Genetic Analyzer unter den zuvor beschriebenen PCR-Konditionen (HACKAUF und WEHLING 2002, HACKAUF et al. 2009) genotypisiert. Die Genotypisierung mit Diversity Arrays Technology (DArT)-Markern erfolgte wie bei BOLIBOK-BRAGOSZEWSKA et al. (2009) beschrieben. Primer-Design für Kandidatengene aus dem Stärkestoffwechsel, dem Regulationsnetzwerk der Blühzeitpunktkontrolle und anderen Merkmalskategorien, die Darstellung von PCR-Fragmenten aus genomischer Roggen-DNA sowie eine vergleichende Genkartierung wurde wie bei HACKAUF und WEHLING (2005) sowie HACKAUF et al. (2009) beschrieben durchgeführt. Die Sequenzanalysen von Kandidatengenen sowie die Detektion von SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) und Indels (*insertion/deletion-polymorphisms*) wurden mit Hilfe der Programme Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER und LISCHER 2010) und TASSEL 3.0.68 (BRADBURY et al. 2007) vorgenommen. Dabei identifizierte SNPs mit einer Allelfrequenz kleiner als 5% wurden bei der Berechnung des LD nicht berücksichtigt.

Die Markergenotypen der Einfachkreuzungen wurden aus den elterlichen molekularen Genotypen abgeleitet. Die für Assoziationsstudien zu berücksichtigende Populationsstruktur wurde mit Hilfe des Programms STRUCTURE (PRITCHARD et al. 2000) bzw. über eine Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) im Softwarepaket DARwin (PERRIER und JACQUEMOUD-COLLET 2006) auf Grundlage der DArT-Marker ermittelt. Für die Modellformulierungen der Assoziationsstudie wurde die Q-Matrix aus STRUCTURE als Kovariate verwendet. Als zweite Kovariate wurde auf Grundlage der DArT-Marker eine Kinship-Matrix mit Hilfe des Programms SPAGeDi (HARDY und VEKEMANS 2002) nach der Methode von HARDY (2003) erstellt.

Um die Effekte der beiden Kovariaten auf die Assoziationsstudie zu untersuchen, wurden Marker-Merkmalssoziationen zunächst mit Hilfe eines generell linearen Modells (GLM) unter Berücksichtigung der Populationsstruktur sowie mit Hilfe eines gemischt linearen Modells (MLM) zur Bestimmung der Effekte der Verwandtschaftsbeziehung ermittelt.

Da beide Kovariaten einen Effekt auf die Ergebnisse der Assoziationsstudie hatten (nicht gezeigt), erfolgte die Identifizierung von Marker-Merkmalssoziationen mit Hilfe eines gemischt linearen Modells (YU et al. 2006) mit

dem Programm TASSEL 3.0.68 unter Berücksichtigung der Populationsstruktur Q und der Kinship-Matrix K:

$$\text{Merkmal} = \text{Marker} + Q + K + \text{Fehler.}$$

In der Assoziationsstudie wurden Marker mit einer Allelfrequenz unter 5% nicht berücksichtigt. Die Identifizierung assoziierter Marker erfolgte bei unterschiedlichen Signifikanzniveaus ($\alpha=0,05$, $\alpha=0,01$ und $\alpha=0,001$). Informationen über die Kartierung von QTL im Reis wurden aus der Gramene QTL-Datenbank (YOUENS-CLARK et al. 2011) abgefragt.

Ergebnisse und Diskussion

Im Untersuchungsmaterial konnte eine kontinuierliche Verteilung für die Merkmale WUH über 9 Umwelten sowie für das Merkmal TKG über 4 Umwelten beobachtet werden (*Abbildung 2*). Beide Merkmale offenbarten deutliche Unterschiede zwischen den Prüfgliedern.

Die Varianzanalyse über 9 bzw. 4 Umwelten zeigte für beide Merkmale signifikante Unterschiede zwischen den Prüfgliedern, Orten sowie für die Genotyp-Umwelt-Interaktion ($P<0,05$; *Tabelle 1*). Die ausgeprägte Umweltabhängigkeit der Merkmale dokumentiert, dass die phänotypische Charakterisierung solch komplex vererbter Merkmale in multiplen Umwelten durchgeführt werden sollte, um eine Erfassung der Leistungsfähigkeit individueller Genotypen mit ausreichender Genauigkeit zu erzielen. Eine vergleichbar hohe Prüfintensität wie in der vorliegenden Studie wurde in publizierten QTL-Studien bei Roggen bislang nur bei FALKE et al. (2009) beschrieben.

Im Untersuchungsmaterial zeigten sowohl WUH als auch TKG hohe Heritabilitäten. Diese Daten stehen in guter Übereinstimmung zu den in Testkreuzungen von Introgressionslinien geschätzten Heritabilitäten $\hat{H}^2=0,90$ für WUH und $\hat{H}^2=0,85$ für TKG (FALKE et al. 2009).

Die Assoziationskartierung gewinnt zunehmend an Bedeutung für die Kartierung von QTL in pflanzlichen Genomen (INGVARSSON und STREET 2011). Bei der Durchführung von Assoziationsstudien sind Kenntnisse über eine potenzielle Populationsstruktur erforderlich, um das Risiko falsch-positiver Marker-Merkmalbeziehungen zu reduzieren. Sowohl mit dem Programm STRUCTURE, als auch mit DARwin war es möglich, 8 Gruppen zu identifizieren,

Tabelle 1: Schätzwerte der Varianzkomponenten und Heritabilitäten (\hat{H}^2) der Testkreuzungsnachkommenschaften (G) für Wuchshöhe (WUH) und Tausendkornmasse (TKG) über multiple Umwelten (O)

Table 1: Estimates of variance components and heritabilities (\hat{H}^2) of rye test-crosses (G) in multiple environments (O) for plant height (WUH) and thousand grain weight (TKG)

Varianzkomponente	WUH	TKG
σ_G^2	13,39*	3,37*
σ_O^2	141,78*	2,75*
$\sigma_{G \times O}^2$	8,57*	0,35*
σ_F^2	19,25	2,82
\hat{H}^2	0,88	0,68

* signifikant bei $\alpha=0,05$

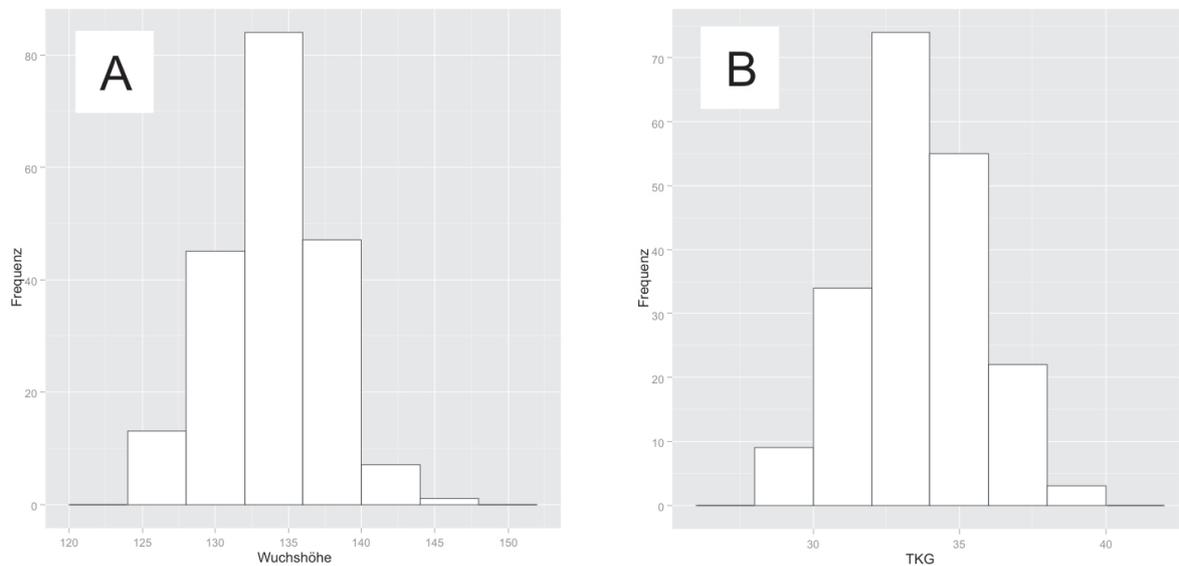


Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung für die Merkmale Wuchshöhe (A) und Tausendkornmasse (B) von 197 Testkreuzungen über multiple Umwelten in 2010

Figure 2: Frequency distributions for the traits plant height (A) and thousand grain weight (B) of 197 test-crosses in multiple environments in 2010

in die sich die in 2010 untersuchten 197 Testkreuzungen unterteilen ließen (Abbildung 3).

Im Untersuchungsmaterial zeigten sich 3117 teilweise kartierte (BOLIBOK-BRAGOSZEWSKA et al. 2009) DArT-Marker informativ. Nach Ausschluss der Marker mit einer Allelfrequenz unter 5% reduzierte sich die Anzahl an DArT-Markern auf 1653 (53%) und die der Mikrosatellitenallele von 194 auf 120 (61,9%). Für 278 DArT-Marker (16,8%) sowie 29 SSR-Allele (24,2%) an 24 SSR-Loci offenbarte sich bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ eine signifikante Assoziation zu den Merkmalen WUH (124 DArT + 8 SSR) sowie TKG (154 DArT + 21 SSR). Von den dabei identifizierten 307 Markern waren vierzehn (4,6%) mit beiden untersuchten Merkmalen assoziiert. Durch die identifizierten Marker werden bis zu 6,4% der phänotypischen Varianz für WUH erklärt, während die maximal durch einzelne Marker erklärte Varianz für TKG 10,5% beträgt (Tabelle 2). Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,01$ reduzierte sich die Anzahl der assoziierten Marker für WUH bzw. TKG auf 32 bzw. 50 DArT-Marker und 1 bzw. 5 SSR-Allele. Diese 82 Marker waren jeweils mit nur einem Merkmal assoziiert und erklärten eine phänotypische

Tabelle 2: Erklärte phänotypische Varianz (V_p) der assoziierten Marker für Wuchshöhe (WUH, cm) sowie Tausendkornmasse (TKG, g) bei 3 unterschiedlichen Signifikanzniveaus

Table 2: Proportion of phenotypic variance (V_p) for plant height (WUH, cm) and thousand grain weight (TKG, g) explained by associated markers in case of three significance levels

	$\alpha=0,05$		$\alpha=0,01$		$\alpha=0,001$	
	WUH	TKG	WUH	TKG	WUH	TKG
Marker (n)	132	175	33	55	2	15
$\bar{\phi} V_p$ (%)	3,2	3,5	4,5	5,1	6,2	6,98
V_p min (%)	1,95	1,9	3,4	3,3	6,1	5,3
V_p max (%)	6,4	10,5	6,4	10,5	6,2	10,5

Varianz zwischen 3,4% und 6,4% für WUH und 3,3% und 10,5% für TKG (Tabelle 2). Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,001$ konnten Assoziationen von 2 DArT-Markern zu WUH und von 15 DArT-Markern zu TKG identifiziert werden. Diese 17 Marker erklärten eine Varianz von maximal 6,2% bzw. 10,5% für WUH bzw. TKG. Die assoziierten Marker zeigten sich auf allen 7 Roggenchromosomen verteilt. Gegenwärtig arbeiten wir an der Integration bislang noch nicht chromosomal lokalisierter DArT-Marker in die genetische Karte des Roggens. Diese integrierte Karte wird es ermöglichen, das intrachromosomale Ausmaß des Kopplungsungleichgewichtes in Elitezuchtmaterial des Roggens zu beschreiben.

Die Sequenzinformation der EST-basierten SSR sowie über einen Teil der für Roggen etablierten DArT-Marker ermöglichte einen vergleichenden Ansatz der Genkartierung von Markern, die mit QTL assoziiert sind. Die Zahl signifikanter BLAST-Hits zum Reissenom bei hohem Signifikanzniveau ($E \leq 10^{-6}$) zeigt, dass ein Teil der DArT-Marker homolog zu bekannten oder postulierten Gensequenzen in Reis ist. Unter 2790 verfügbaren DArT-Sequenzen wiesen 819 (29,4%) einen signifikanten BLASTX-Treffer zu 525 individuellen Proteinsequenzen aus Reis und 889 (31,9%) einen signifikanten TBLASTX-Treffer zu 569 Genmodellen aus *Brachypodium distachyon* auf. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch über DArT-Marker aus Hafer berichtet (TINKER et al. 2009). Unsere Ergebnisse zeigen, dass zahlreiche der DArT-Marker des Roggens Abschnitte von Genen oder Gen-reichen Regionen repräsentieren. Ungefähr $\frac{1}{3}$ der identifizierten Gen-Regionen werden durch mehr als einen DArT-Marker dargestellt.

Insgesamt konnten wir für 41 (13,4%) der 307 assoziierten Marker eine homologe Sequenz in Reis identifizieren. Die zu den assoziierten Markern orthologen Reissenquenzen sind in Genomregionen lokalisiert, in denen zuvor Reis-QTL für agronomische bzw. Qualitätsmerkmale beschrieben wurden

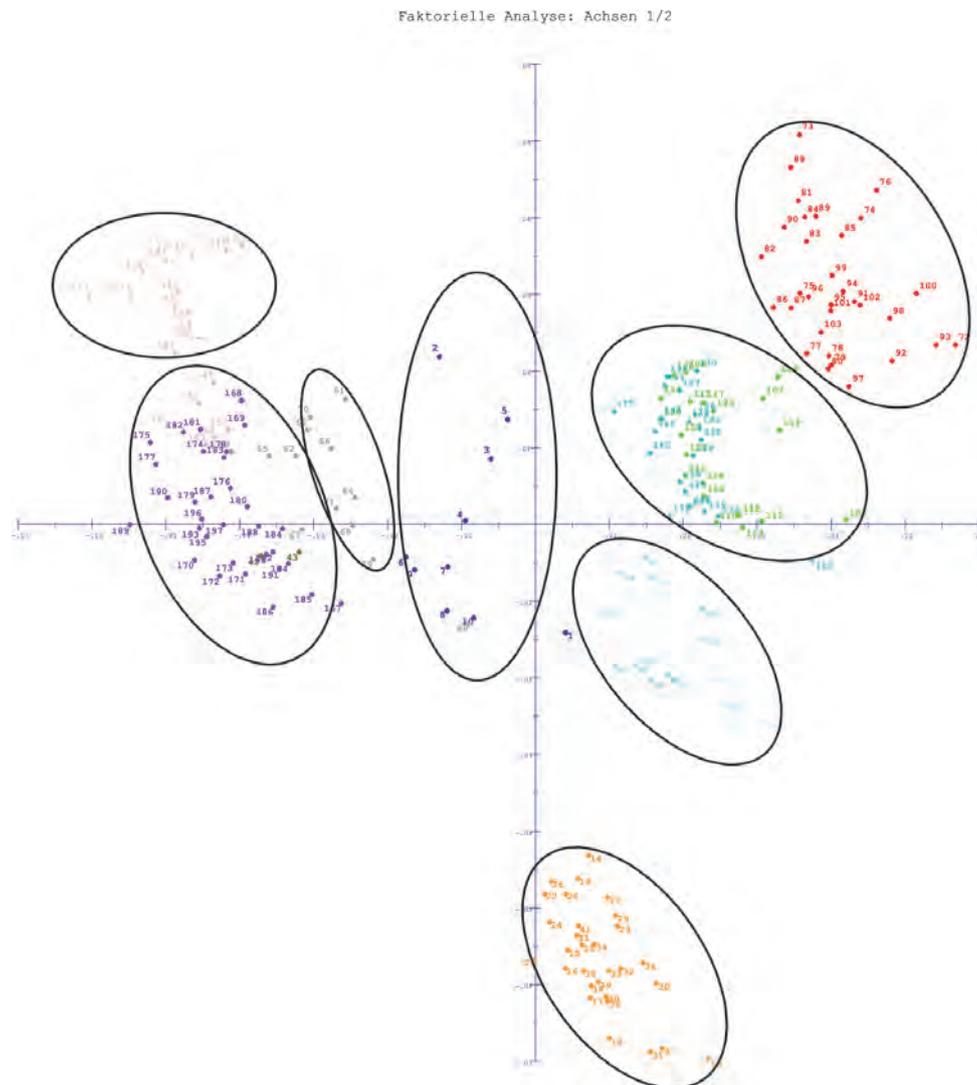


Abbildung 3: Hauptkoordinatenanalyse von 197 Testkreuzungen. Eine Einteilung des Untersuchungsmaterials in Populationen basierend auf genetischen Unterschieden wurde mit Hilfe von 3117 DArT-Markern vorgenommen. Der durch diese Darstellung erklärte Anteil an der Gesamtvarianz beträgt 18%.

Figure 3: Principal coordinate analysis of 197 rye test-crosses. 3117 DArT markers were used to classify population membership for each genotype based on genetic differences. The percentage of total variance explained by both coordinates is 18%.

(Abbildung 4). Homologe QTL-Regionen für Wuchshöhe, Korngröße, Reife- und Blütezeitpunkt wurden bereits früher zwischen verschiedenen Arten aus der Familie der Süßgräser (Reis, Mais, Hirse, Gerste und Weizen) beschrieben (LIN et al. 1995, PATERSON et al. 1995). Die Integration relevanter Daten über komplex vererbte Merkmale aus Reis und anderen verwandten Gräsern bietet ergänzende Informationen sowohl im Hinblick auf eine Einschätzung der Güte identifizierter Marker-Merkmalbeziehungen bei Roggen als auch hinsichtlich einer weiteren molekularen Charakterisierung von QTL im Roggen (vgl. ZHU und ZHAO 2007, WAUGH et al. 2009). Vor allem in konservierten Genombereichen mit ausgeprägter Syntanie zwischen evolutionär verwandten Gräsern stellt die vergleichende Genkartierung eine effiziente Alternative zur Identifizierung von QTL in komplexen Getreidegenomen dar (WAUGH et al. 2009).

Ein ausgeprägt konserviertes Segment als Träger eines QTL für Tausendkornmasse konnte in der vorliegenden Studie beispielsweise auf Reischromosom R3 identifiziert werden. Das orthologe Reisgen des mit TKG assoziierten Markers *M37(tgrwt)-7R* ($P=0,00764$) liegt in einem 35 cM Segment, auf dem zuvor 13 verschiedene Reisgenmodelle identifiziert werden konnten, deren orthologe Marker im Roggen auf Chromosom 7R lokalisiert sind (HACKAUF et al. 2009). Zu diesen Markern zählen *Xscm118-7R*, *Xtasut-7R* sowie *Xscm63-7R*, die ihrerseits gekoppelt sind mit dem genomischen SSR-Marker *Xscm40-7R* (WRICKE und HACKAUF 2007). Für *Xscm40-7R* wurde Kopplung zu einem Majorgen für TKG beschrieben (WRICKE 2002, WRICKE und HACKAUF 2007). Im Reis wurde in diesem Bereich ein qualitäts-bestimmender QTL (AQC036, vgl. YOUENS-CLARK et al. 2011) identifiziert, der ebenfalls

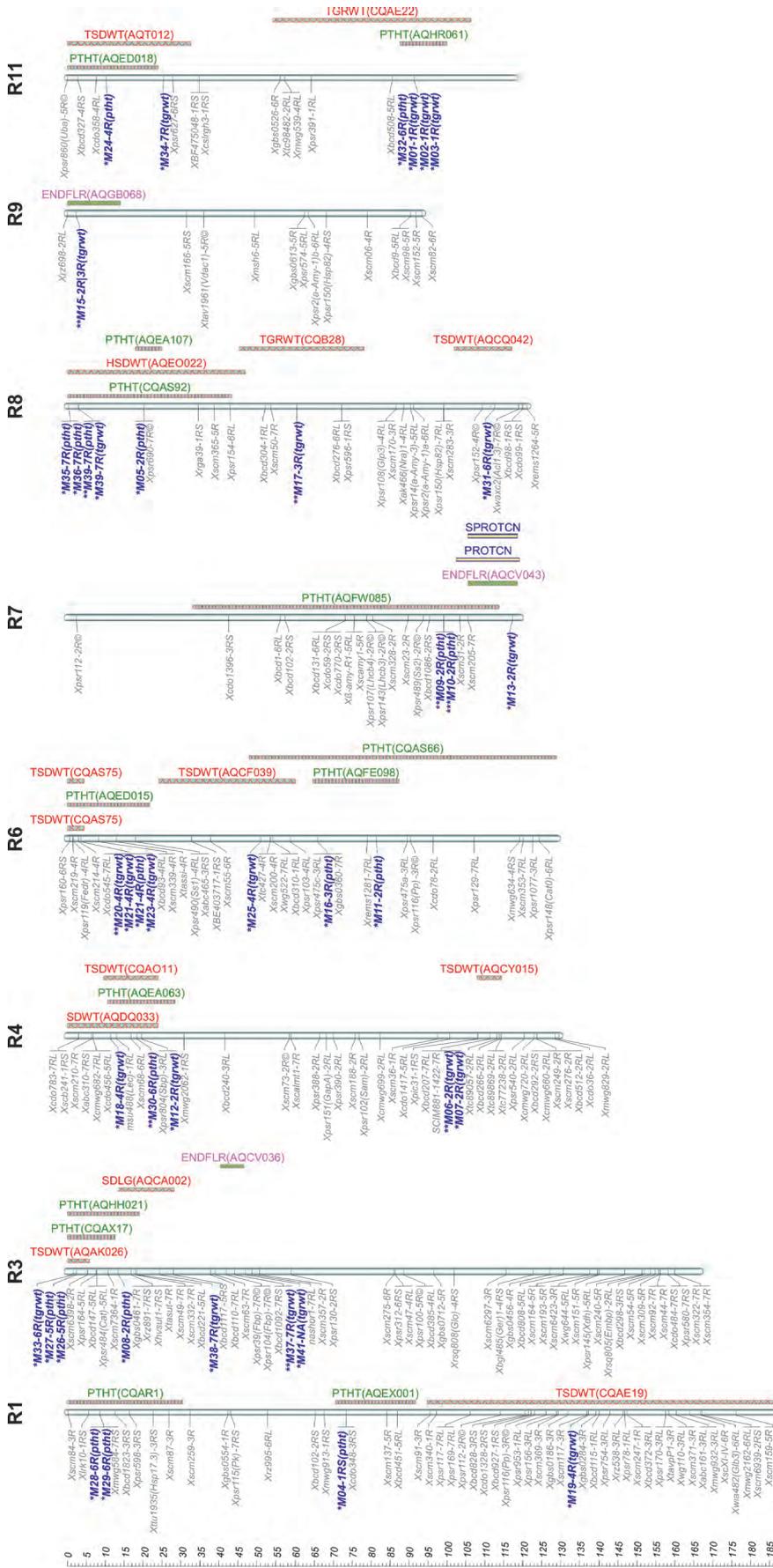


Abbildung 4: Vergleichende Genkartierung für komplex vererbte Merkmale in Roggen und Reis. Die mit QTL im Roggen assoziierten Marker M sind über die Position ihrer orthologischen Gensequenzen im Reis eingezeichnet. Die Positionen aller übrigen Marker stammen aus HACKAUF et al. (2009). Die Vertrauensintervalle für die Position der Reis-QTL sind jeweils rechts, Akzessionsnummern der Reis-QTL (Abkürzungen siehe unten) in Klammern angegeben. Den Markern vorangestellte Sterne kennzeichnen das Signifikanzniveau der Assoziation (*: $\alpha=0,05$; **: $\alpha=0,01$; ***: $\alpha=0,001$).

Figure 4: Comparative mapping of QTL in rye and rice. Markers associated with QTL in rye are given via the position of their orthologous sequences in rice. The positions of all remaining rye markers as described in HACKAUF et al. (2009). The confidence intervals of the position of rice QTL are given on the right side of a chromosome. The accession numbers of the indicated QTLs are given in brackets (PTHHT: plant height; HSDWT: hundred seed weight; TGRWT: thousand grain weight; TSDWT: thousand seed weight; SDLG: seed length; PROTCIN: total protein content; SPROTIN: soluble protein content; ENDFLR: floury endosperm). Prepend stars of a marker name correspond to the level of significance to detect association (*: $\alpha=0,05$; **: $\alpha=0,01$; ***: $\alpha=0,001$).

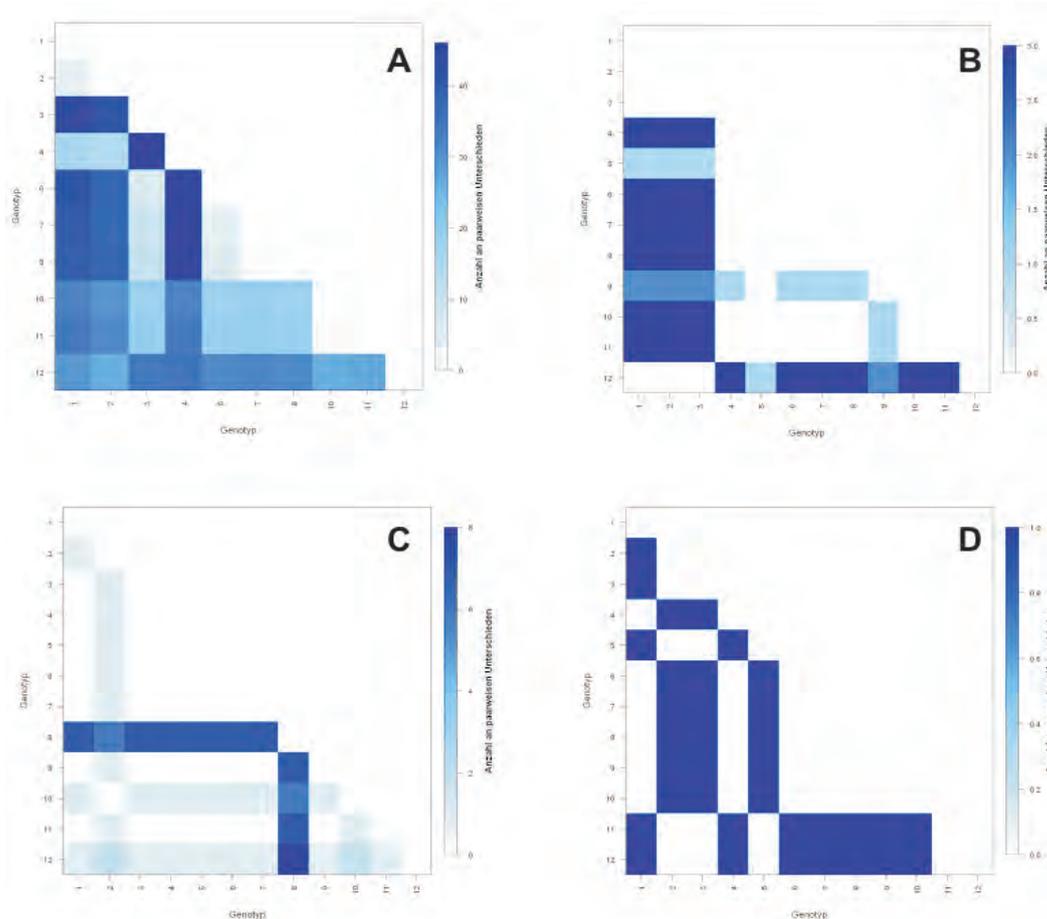


Abbildung 5: Analyse der Sequenzvariation in Kandidatengenen aus dem Stärkestoffwechsel (A und B) sowie dem Regulationsnetzwerk des Blütezeitpunktes (C und D) für 12 ausgewählte Inzuchtlinien bei Roggen (Dunklere Farben: größere Unterschiede zwischen individuellen Genotypen, weiß: kein Unterschied der Sequenzen zwischen individuellen Genotypen).

Figure 5: Sequence variation of candidate genes for starch metabolism (A and B) and days to heading (C and D) in 12 selected rye inbred lines (Dark colours indicate higher polymorphism rate between individual genotypes, white: no polymorphism observed).

Einfluss auf das Merkmal Kornmasse besitzt (ASHIDA et al. 2009). Für qualitative Merkmale des Roggens haben sich genomische Informationen aus evolutionär verwandten Gräsern als wertvolle Ressource bei der Entwicklung molekularer Marker erwiesen (HACKAUF und WEHLING 2005, MAGO et al. 2005, COLLINS et al. 2008, HACKAUF et al. 2012). Auf Grundlage der hier vorgestellten Ergebnisse besteht nun auch für quantitativ vererbte Merkmale des Roggens die Möglichkeit, die Sequenzinformationen über Gene aus konservierten Bereichen, wie beispielsweise dem beschriebenen Segment auf Reischromosom R3, systematisch als Kandidaten zu nutzen, um nach Assoziationen mit QTL zu suchen.

Ergänzend zu genomweiten Studien stellt die Assoziationskartierung von Kandidatengenen in Hybridrogen-Zuchtpopulationen einen alternativen Ansatz dar, um gezielt genbasierte Marker für komplex vererbte Merkmale bei Roggen zu entwickeln. Aus verwandten Grasgenomen sind inzwischen eine Reihe von Genen isoliert und funktionell charakterisiert worden, die von uns als Kandidatengene für Merkmale wie Korngewicht, Pflanzenarchitektur, Blühzeitpunkt oder Stärkebiosynthese im Roggen genutzt

wurden. Die Spezifität der amplifizierten Fragmente solcher Kandidatengene wurde mittels Sanger-Sequenzierung an einer Stichprobe von 12 Inzuchtlinien validiert. Die zu beobachtende Sequenzvariabilität (Abbildung 5) sowie das teilweise ausgeprägt niedrige LD (Abbildung 6A) dokumentieren, dass diese subgenomischen Bereiche des Roggens geeignet sind, um nach Assoziationen zu QTL für Merkmalsgene zu suchen.

Zusammenfassung

Genomweite Assoziationsstudien werden zunehmend in selbstbefruchtenden Getreidearten genutzt, um Gene für agronomisch relevante Merkmale zu identifizieren. Die vorliegende Studie dokumentiert erste Ergebnisse zur genomweiten Assoziationskartierung beim Fremdbefruchter Roggen. DaRT-Marker haben sich als geeignetes Werkzeug erwiesen, um die Struktur der in der untersuchten Population vorgehaltenen genetischen Variation zu charakterisieren. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass diese microarray-basierte Markertechnologie geeignet ist, um Assoziationen mit QTL für hoch heritable Merkmale in Elitezuchtmate-

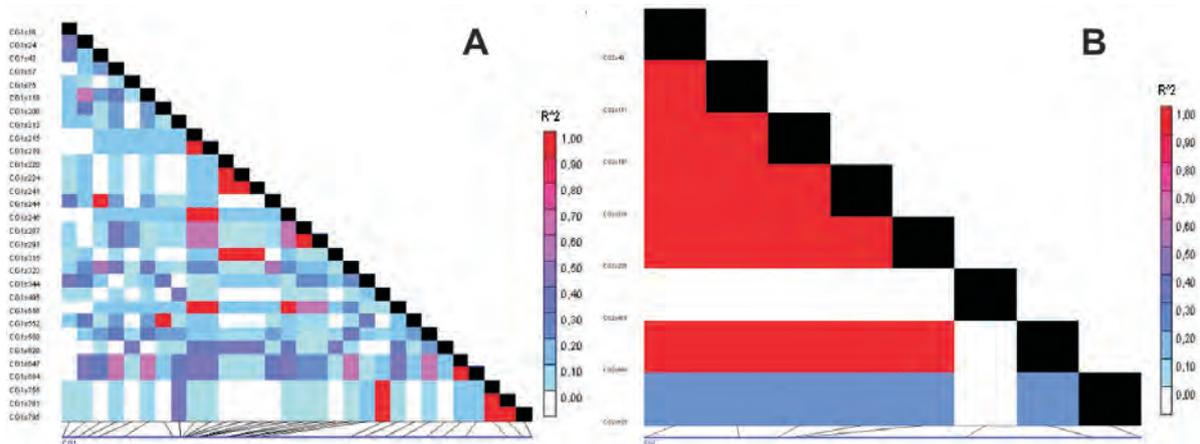


Abbildung 6: Kopplungsungleichgewicht- (LD) Heatplot für ein Kandidatengen aus dem Stärkestoffwechsel (A) bzw. dem Regulationsnetzwerk des Blütezeitpunktes (B). Jedes Feld des Rasters repräsentiert das Ausmaß des geschätzten LDs (mittels R^2) aller paarweisen Vergleiche zwischen polymorphen Positionen mit Allelfrequenzen $> 0,05$. Die Legenden für die R^2 -Werte sind rechts angeführt.

Figure 6: Linkage disequilibrium (LD) heat plot of a candidate gene from starch metabolisms (A) and flowering time control pathway (B). Each grid represents the degree of LD estimated by R^2 for each pairwise comparison between polymorphic sites with a minor allele frequency (MAF) > 0.05 . The colour legend for R^2 values is given on the right side.

rial bei Winterroggen zu identifizieren. Mit Hilfe dieser Marker ist es möglich, Genvarianten mit einem Effekt auf Wuchshöhe sowie Tausendkornmasse zu charakterisieren und in weiterführenden Untersuchungen zu validieren. Die identifizierten Marker können dazu beitragen, die Effizienz eines Hybridzuchtprogramms bei Roggen zu erhöhen, indem Zuchtlinien als Träger wertvoller Genvarianten gezielt identifiziert und in der Zucht eingesetzt werden. Weitere Studien sind erforderlich um zu prüfen, ob über diesen Ansatz auch QTL für das mit Abstand bedeutendste Merkmal in der Getreidezüchtung, den Kornertrag, erfasst werden können. Die Ausprägung des Kornertrags ist durch seine besondere Komplexität gekennzeichnet und das Ergebnis aller Prozesse der vegetativen und generativen Entwicklung sowie ihrer Wechselwirkung mit der Umwelt. Stabil exprimierte QTL, die zu einem höheren Kornertrag führen, sind daher wichtige Zielgrößen in der Hybridrogenzüchtung. Auf Grundlage einer neu von uns etablierten Kalibrationsgleichung zur verlässlichen Bestimmung von Protein-, Stärke- und Arabinoxylangehalt im Korn mittels Nahinfrarotspektroskopie werden künftig auch weitere qualitätsbestimmende Parameter in die Assoziationskartierung einbezogen werden können.

Weitere Analysen sind erforderlich, um das Ausmaß des LD in den kommerziellen Inzuchtlinien aus beiden heterotischen Gruppen zu bestimmen und abschätzen zu können, wie ausgeprägt die Markerdichte in diesem Material sein muss, um QTL mit kleinen Effekten identifizieren zu können. Umfangreiche DNA-Markerkollektionen können inzwischen auch in komplexen Getreidegenomen effizient mittels neuer Sequenzierverfahren erstellt werden (ELSHIRE et al. 2011). Aufbauend auf die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse verspricht eine Genotypisierung durch Sequenzierung, weitere Marker für QTL im Roggen identifizieren zu können.

Danksagung

Wir danken Gunda Kölzow und Rita Heese für ihre exzellente technische Assistenz. Diese Studie wurde durch die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz gefördert.

Literatur

- ASHIDA K, IIDA S, YASUI T, 2009: Morphological, physical, and chemical properties of grain and flour from chalky rice mutants. *Cereal Chem* 86: 225-231.
- BOLIBOK-BRAGOSZEWSKA H, HELLER-USZYŃSKA K, WENZL P, USZYŃSKI G, KILIANA, RAKOCZY-TROJANOWSKA M, 2009: DArT markers for the rye genome - genetic diversity and mapping. *BMC Genomics* 10: 578 (DOI: 10.1186/1471-2164-10-578).
- BÖRNER A, KORZUN V, VOYLOKOV AV, WEBER WE, 1999: Detection of quantitative trait loci on chromosome 5R of rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* 98: 1087-1090.
- BÖRNER A, KORZUN V, VOYLOKOV AV, WORLAND AJ, WEBER WE, 2000: Genetic mapping of quantitative trait loci in rye (*Secale cereale* L.). *Euphytica* 116: 203-209.
- BRADBURY PJ, ZHANG Z, KROON D E, CASSTEVENS T M, RAMDOSS Y, BUCKLER ES, 2007: TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23: 2633-2635.
- BUNDESSORTENAMT, 2010: Beschreibende Sortenliste - Getreide, Mais, Öl- und Faserpflanzen, Leguminosen, Rüben, Zwischenfrüchte 2011. Deutscher Landwirtschaftsverlag, Hannover.
- COLLINS NC, SHIRLEY NJ, SAEED M, PALLOTTA M, GUSTAFSON JP, 2008: An ALMT1 gene cluster controlling aluminum tolerance at the Alt4 locus of rye (*Secale cereale* L.). *Genetics* 179: 669-682.
- CROSSA J, BURGUEÑO J, DREISIGACKER S, VARGAS M, HERRERA-FOESSEL SA, LILLEMOM, SINGH RP, TRETOWAN R, WARBURTON M, FRANCO J, REYNOLDS M, CROUCH JH, ORTIZ R, 2007: Association analysis of historical bread wheat germ-

- plasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. *Genetics* 177: 1889-1913.
- ELSHIRE RJ, GLAUBITZ JC, SUN Q, POLAND JA, KAWAMOTO K, BUCKLER ES, MITCHELL SE, 2011: A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* 6(5):e19379. (DOI:10.1371/journal.pone.0019379).
- EXCOFFIER L, LISCHER HEL, 2010: Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564-567.
- FALKE KC, SUSIĆ Z, WILDE P, WORTMANN H, MÖHRING J, PIEPHO HP, GEIGER HH, MIEDANER T, 2009: Testcross performance of rye introgression lines developed by marker-assisted backcrossing using an Iranian accession as donor. *Theor Appl Genet* 118: 1225-1238.
- FRISCH M, THIEMANN A, FU J, SCHRAG TA, SCHOLTEN S, MELCHINGER AE, 2010: Transcriptome-based distance measures for grouping of germplasm and prediction of hybrid performance in maize. *Theor Appl Genet* 120: 415-427.
- GEIGER HH, MIEDANER T, 2009: Rye breeding. In: Carena MJ (Ed.), *Cereals*, pp. 157-181. *Handbook of Plant Breeding*, Vol. 3. Springer Science + Business Media.
- GEIGER HH, SCHNELL FW, 1970: Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). *Crop Sci* 10: 590-593.
- HACKAUF B, WEHLING P, 2002: Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome. *Plant Breed* 121: 17-25.
- HACKAUF B, WEHLING P, 2005: Approaching the self-incompatibility locus Z in rye (*Secale cereale* L.) via comparative genetics. *Theor Appl Genet* 110: 832-845.
- HACKAUF B, RUDD S, VAN DER VOORT JR, MIEDANER T, WEHLING P, 2009: Comparative mapping of DNA sequences in rye (*Secale cereale* L.) in relation to the rice genome. *Theor Appl Genet* 118: 371-384.
- HACKAUF B, KORZUN V, WORTMANN H, WILDE P, WEHLING P, 2012: Development of COS markers linked to the restorer gene Rfp1 in rye. *Mol Breed*, in press.
- HARDY OJ, 2003: Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterisation of isolation by distance processes using dominant genetic markers. *Mol Ecol* 12: 1577-1588.
- HARDY OJ, VEKEMANS X, 2002: SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2: 618-620.
- HASENEYER G, SCHMUTZER T, SEIDEL M, ZHOU R, MASCHER M, SCHÖN CC, TAUDIEN S, SCHOLZ U, STEIN N, MAYER KFX, BAUER E, 2011: From RNA-seq to large-scale genotyping - genomics resources for rye (*Secale cereale* L.). *BMC Plant Biol* 11: 131. (DOI: 10.1186/1471-2229-11-131).
- INGVARSSON PK, STREET NR, 2011: Association genetics of complex traits in plants. *New Phytol* 189: 909-922.
- LI Y, HASENEYER G, SCHÖN CC, ANKERST DP, KORZUN V, WILDE P, BAUER E, 2011a: High levels of nucleotide diversity and fast decline of linkage disequilibrium in rye (*Secale cereale* L.) genes involved in frost response. *BMC Plant Biol* 11: 6. (DOI: 10.1186/1471-2229-11-6).
- LI Y, BÖCK A, HASENEYER G, KORZUN V, WILDE P, SCHÖN CC, ANKERST DP, BAUER E, 2011b: Association analysis of frost tolerance in rye using candidate genes and phenotypic data from controlled, semi-controlled, and field phenotyping platforms *BMC Plant Biol* 11: 146. (DOI:10.1186/1471-2229-11-146).
- LIN YR, SCHERTZ KF, PATERSON AH, 1995: Comparative analysis of QTLs affecting plant height and maturity across the poaceae, in reference to an interspecific sorghum population. *Genetics* 141: 391-411.
- MAENHOUT S, DE BAETS B, HAESAERT G, 2009: Prediction of maize single-cross hybrid performance: support vector machine regression versus best linear prediction. *Theor Appl Genet* 120: 415-427.
- MAGO R, MIAH H, LAWRENCE GJ, WELLINGS CR, SPIELMEYER W, BARIANA HS, MCINTOSH RA, PRYOR AJ, ELLIS JG, 2005: High-resolution mapping and mutation analysis separate the rust resistance genes Sr31, Lr26 and Yr9 on the short arm of rye chromosome 1. *Theor Appl Genet* 112: 41-50.
- MASOJĆ P, MILCZARSKI P, 2005: Mapping QTLs for alpha-amylase activity in rye grain. *J Appl Genet* 46: 115-123.
- MATTHIES IE, VAN HINTUM T, WEISE S, RÖDER MS, 2012: Population structure revealed by different marker types (SSR or DArT) has an impact on the results of genome-wide association mapping in European barley cultivars. *Mol Breed*, in press (DOI: 10.1007/s11032-011-9678-3).
- MIEDANER T, HÜBNER M, 2011: Qualitätsansprüche für unterschiedliche Verwendungszwecke bei Hybridroggen. Bericht 61. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2010, pp. 45-49. LFZ Raumberg-Gumpenstein, Irdning.
- MÜCKE M, MEYERCORDT A, 2009: Bundesweite Zusammenstellung der Landessortenversuche Winterroggen und Wintertriticale im Ökologischen Landbau 2008. Landwirtschaftskammer Niedersachsen. Pflanzenbauliche Versuchsbericht-Datenbank, Informationssystem Integrierte Pflanzenproduktion e.V., Bad Kreuznach [Internet: http://www.isip.de/coremedia/generator/isip/Versuchsberichte/Versuchsberichte,templateId=renderPrintView.html?hortigategeweg=_swh_2/wo/uDhrIZrOTgAtGgqa1QNhz0/6.3.6.3.23.7.1.1.11.1; verifiziert 28 Jan 2012].
- NEUMANN K, KOBILJSKI B, DENCIC, VARSHNEY RK, BÖRNER A, 2011: Genome-wide association mapping: a case study in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Breed* 27: 37-58.
- PATERSON AH, LIN YR, LI Z, SCHERTZ KF, DOEBLEY JF, PINSON SR, LIU SC, STANSEL JW, IRVINE JE, 1995: Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci. *Science* 269: 1714-1718.
- PERRIER X, JACQUEMOUD-COLLET JP, 2009: DARwin5, Dissimilarity Analysis and Representation for Windows. CIRAD, Agricultural Research for Development. [Internet: <http://darwin.cirad.fr/darwin/>; verifiziert 28 Jan 2012].
- PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY PJ, 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Internet: <http://www.R-project.org/>].
- TOLLENAAR M, LEE EA, 2006: Dissection of physiological processes underlying grain yield in maize by examining genetic improvement and heterosis. *Maydica* 51: 399-408.
- RAMAN H, STODART B, RYAN PR, DELHAIZE E, EMEBIRI L, RAMAN R, COOMBES N, MILGATE A, 2010: Genome-wide association analyses of common wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm identifies multiple loci for aluminium resistance. *Genome* 53: 957-966.
- SCHRAG TA, MELCHINGER AE, SORENSEN AP, FRISCH M, 2006: Prediction of single-cross hybrid performance for grain yield and grain dry matter content in maize using AFLP markers associated with QTL. *Theor Appl Genet* 113: 1037-1047.
- SPIERTZ JHJ, 2010: Nitrogen, sustainable agriculture and food security. A review. *Agron Sustain Dev* 30: 43-55.
- TINKER NA, KILIAN A, WIGHT CP, HELLER-USZYNSKAK, WENZL P, RINES HW, BJØRNSTAD A, HOWARTH CJ, JANNINK JL, ANDERSON JM, ROSSNAGEL BG, STUTHMAN DD, SORRELLS ME, JACKSON EW, TUVESON S, KOLB FL, OLSSON O, FEDERIZZI LC, CARSON ML, OHM HW, MOLNAR SJ, SCOLES

- GJ, ECKSTEIN PE, BONMAN JM, CEPLITIS A, LANGDON T, 2009: New DArT markers for oat provide enhanced map coverage and global germplasm characterization. *BMC Genomics* 10: 39. (DOI:10.1186/1471-2164-10-39).
- VUYLSTEKE M, KUIPER M, STAM P, 2000: Chromosomal regions involved in hybrid performance and heterosis: their AFLP (R)-based identification and practical use in prediction models. *Heredity* 85: 208-218.
- WAUGH R, JANNINK JL, MUEHLBAUER GJ, RAMSAY L, 2009: The emergence of whole genome association scans in barley. *Curr Opin Plant Biol* 12: 218-222.
- WRICKE G, 2002: Two major genes for kernel weight in rye. *Plant Breed* 121: 26-28.
- WRICKE G, HACKAUF B, 2007: Towards the inheritance of kernel weight in rye. *Vortr Pflanzenzüchtg* 71: 22-26.
- YOUENS-CLARK K, BUCKLER E, CASSTEVENS T, CHEN C, DEC-LERCK G, DERWENT P, DHARMAWARDHANA P, JAISWAL P, KERSEY P, KARTHIKEYAN AS, LU J, MCCOUCH SR, REN L, SPOONER W, STEIN JC, THOMASON J, WEI S, WARE D, 2011: Gramene database in 2010: updates and extensions. *Nucleic Acid Res* 39, Suppl 1: D1085-D1094 (DOI 10.1093/nar/gkq1148).
- YU CY, HU SW, ZHAO HX, GUO AG, SUN GL, 2005: Genetic distances revealed by morphological characters, isozymes, proteins and RAPD markers and their relationships with hybrid performance in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 110: 511-518.
- YU J, PRESSOIR G, BRIGGS WH, BI IV, YAMASAKI M, DOEBLEY JF, MCMULLEN MD, GAUT BS, NIELSEN DN, HOLLAND JB, KRESOVICH S, BUCKLER ES, 2006: A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet* 2: 203-208.
- ZHU M, ZHAO S, 2007: Candidate gene identification approach: progress and challenges. *Int J Biol Sci* 3: 420-427.

Anmerkung: Die Online-Version des Tagungsbandes enthält alle Abbildungen in Farbe und kann über die Homepage der Jahrestagung (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/> - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchertagung - Saatzüchertagung 2011) oder den korrespondierenden Autor bezogen werden.

Mapping and marker development for breeding of oilseed rape with resistance to *Verticillium longisporum*

Christian Obermeier^{1*}, Muhammed Ali Hossain¹, Rod Snowdon¹,
Jessica Knüfer², Andreas von Tiedemann² and Wolfgang Friedt¹

Abstract

Resistance to *Verticillium longisporum* in oilseed rape has been found to show a quantitative inheritance which originates from the C genome of *Brassica napus*. Tightly linked, broadly applicable markers for marker-assisted breeding of *V. longisporum* resistance have been derived from QTL and validated in oilseed rape populations with diverse genetic backgrounds. Application of the QTL derived molecular markers within genetically diverse and similar DH populations did result in reproducible and pedigree dependent marker-disease-correlations for the markers derived from the C1-minor QTL and the C5-major QTL. The markers are valuable tools for a broader application in marker-assisted selection to combine different resistance loci from cultivated and wild *B. napus* material in breeding programmes. Based on metabolic profiling and co-localization of resistance QTL with QTL for hypocotyl phenylpropanoid compounds, genes from the phenylpropanoid pathway are suggested as candidates for *V. longisporum* resistance.

Keywords

Brassica napus, marker-assisted breeding, phenolics, quantitative trait loci, resistance, *Verticillium longisporum*

Summary

The vascular fungal pathogen *Verticillium longisporum* is causing one of the most important diseases of winter oilseed rape in northern Europe. Long-term control of *V. longisporum* can only be achieved by using cultivars showing effective quantitative resistance. The present study aimed to identify quantitative trait loci (QTL) for *V. longisporum* resistance in a segregating mapping population and develop markers useful in a broader range of breeding materials for marker-assisted breeding for *V. longisporum* resistance. In addition, the study aims to identify candidate genes for *V. longisporum* resistance. This objective was targeted by identifying phenylpropanoid metabolites in the hypocotyls of a mapping population which are correlated with resistance and produce metabolic QTL that co-localize with the major resistance QTL.

Resistance to *V. longisporum* was mapped in the doubled haploid (DH) population E×R53-DH, derived from a cross between the moderately resistant parent Express 617 and the resistant line R53, which was resynthesized from a kale, *B. oleracea* var. *acephala*, and a chinese cabbage, *B. rapa* var. *pekinensis*. Two QTL were identified in the E×R53-DH population. All two QTL originate from the C genome. One major QTL was identified on chromosome C5 and one minor QTL was identified on chromosome C1, respectively, explaining together about 30% of the phenotypic variation. The favorable allele within the QTL region on chromosome C1 is derived from the parent Express 617, whereas the parent R53 contributed the favorable allele within the QTL region on C5. A major QTL on C5 has been identified before in a mapping population with a very different genetic background. Markers flanking the QTL in this former study by RYGULLA et al. (2008) were also found to flank the QTL on C5 in E×R53-DH in our study. This chromosome region therefore appears to play an important role in the expression of *V. longisporum* resistance from very different C genome genetic backgrounds.

Thus, markers from the major QTL region together with markers from the minor QTL region identified in E×R53-DH were also applied to six new DH populations produced from crosses between commercial rapeseed breeding lines and other resynthesized *B. napus* lines with genetically diverse C genome donors. Correlations of resistance reactions with selected markers were determined to evaluate their putative usefulness for marker-assisted selection. Several markers were identified that allowed differentiation between the presence of different QTL combinations on chromosomes C1 and C5 in the new DH populations. These new QTL-derived markers are promising candidates for a broad application in breeding programs using marker-assisted selection for *V. longisporum* resistance.

Histochemical studies indicate that phenolic compounds in the hypocotyl of rapeseed plants may play an important role in the inhibition of systemic spread of *V. longisporum* (EYNCK et al. 2009). To identify specific phenolic compounds involved in *V. longisporum* resistance a high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of soluble and cell wall-bound phenolics was performed for 100 lines of the DH mapping population using a mock- and

¹ Department of Plant Breeding, Justus Liebig University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 GIESSEN

² Department for Crop Sciences, Division of Plant Pathology and Crop Protection, Georg August University, Grisebachstr. 6, D-37077 GÖTTINGEN

* Ansprechpartner: Christian OBERMEIER, christian.obermeier@agrar.uni-giessen.de

V. longisporum inoculated set of plants. Total soluble phenolics concentration of the hypocotyl increased up to 16-fold in single DH lines upon *V. longisporum* inoculation in the hypocotyl 28 days after inoculation. Some phenylpropanoid acids were presumably identified by co-migration with external standards resulting in identical retention times. Significant variations in concentrations of a number of presumable identified phenolic compounds in the soluble phenolics fraction including sinapic, caffeic and ferulic acid were found. These soluble phenolics were also correlated weakly ($R^2 \approx 5\%$) with resistance measured as AUDPC (area under the disease progress curve), but did not produce significant metabolic QTL. In contrast, six yet unidentified HPLC peaks were found to show a weak to medium correlation (R^2 ranging from 7% up to 37%) with resistance and resulting in QTL positions co-localizing with the minor resistance QTL on C1 and the major resistance QTL on C5. One presumably identified compound, caffeic acid, did explain about 15% of the phenotypic variation in AUDPC in the mock-inoculated data set and produced a metabolic QTL co-localizing with the minor resistance QTL on C1. This suggests that caffeic acid is involved in a pre-existing fungal resistance mechanism. Caffeic acid is one of the most common secondary compounds in plants. It is a major precursor of lignin. Also simple phenylpropanoid acids including *p*-coumaric, ferulic, caffeic, sinapic and chlorogenic acids have been reported to exhibit antifungal properties. All these compounds are known to have a widespread distribution in plants and often accumulate after fungal infection (GRAYER and HARBORNE, 1994). Further dissection and identification of metabolic compounds in the soluble, cell wall-bound

and lignin fraction which are correlated with resistance and the identification of metabolic QTL overlapping with resistance QTL in the mapping population might help in the near future to identify candidate genes involved in *V. longisporum* resistance.

Acknowledgements

This work was partially supported by the Association for Promotion of Private German Plant Breeding (GFP) and the Agency for Renewable Resources (FNR) of the Federal Ministry for Nutrition, Agriculture and Consumer Protection (BMELV). The DH populations used for verification of the markers were developed by German rapeseed breeding companies affiliated with the GFP. We thank Jutta Schaper, Anja Pörtl, Bashir Hosseini, and Liane Renno for excellent technical assistance, and Benjamin Wittkop and Florin Lipsa for help in RP-HPLC analysis.

References

- EYNCK C, KOOPMANN B, KARLOVSKY P, VON TIEDEMANN A, 2009: Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Phytopathology* 99: 802-811.
- GRAYER RJ, HARBORNE JB, 1994: A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry* 37: 19-42.
- RYGULLA W, SNOWDON RJ, FRIEDT W, HAPSTADIUS I, CHEUNG WY, CHEN D, 2008: Identification of quantitative trait loci for resistance against *Verticillium longisporum* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytopathology* 98: 215-221.

Development of molecular markers using high-throughput sequencing technology

Friederike Trognitz^{1*} and Bodo Trognitz¹

Abstract

Using high-throughput sequencing technologies it has become feasible and cost-efficient to sequence whole genomes, and the potato genome has recently been completed. Starting from a breeder's perspective, we are interested in knowing the diversity of the bred potato's genepool, as a tool to draw on variability for the creation of new varieties. Therefore, our current project aims at indexing virtually all alleles of major resistance genes (*R* genes) that are present in the entire genepool of common potato (*Solanum tuberosum*). The index can eventually be employed to rapidly design molecular markers for use in selection of specific *R* alleles. Using a nucleotide binding site (NBS) profiling approach, we PCR-amplify *R* gene fragments from a panel of potato cultivars. The PCR primers are designed such that they amplify highly conserved parts and immediately adjacent highly variable parts of *R* alleles. This provides for the secure identification of alleles and assignment to the individual *R* loci on the genome by monitoring a small number of key features in the sequence of the genes. The digitalized sequences generated with Illumina technology will be ordered and assigned via bioinformatics. Specific *R* alleles that are confined to cultivars which share a specific resistance phenotype will be detected and their association with that phenotype will be tested by allele-specific PCR on a small population or group of cultivars segregating for that resistance phenotype. The outcome of this research will help overcome the obstacles to obtaining a sufficient number of reliable molecular markers for selection in breeding of the tetraploid, heterozygous, and inbreeding-intolerant potato.

Keywords

Molecular marker, next generation sequencing, potato, resistance genes, *Solanum tuberosum*

Introduction

Potato is fourth among the world's staple food crops. Relative to wheat and rice, the potato has the fivefold yield per hectare and 1.5 times more energy production per hectare and day (STRUİK and WIERSEMA 1999). Unfortunately, the over 60 diseases caused by bacteria, fungi, nematodes, viruses, viroids, and phytoplasmas impact potato economics. For example the annual costs caused by chemical control

of, and yield losses due to, the late blight disease amount to 5 billion USD (JUDELSON 2009) In Europe, including Austria, up to 15 fungicide sprays are required during a single growing season to control this disease. Therefore, breeders devote considerable resources to the enhancement of disease resistance. True resistance, as to differentiate from avoidance strategies, involves parts of the cell machinery whose activity is triggered by *R* genes, which represent 1-2% of all plant genes (MUN et al. 2009).

The vast diversity of pathogens and their avirulence alleles is complemented by an ever-diversifying array of *R* alleles of the host. *R* alleles to some extent fulfil the role of "health police" in the plant. Some *R* alleles have a short life time until they are overcome by newly emerging virulent pathogen strains, whereas others confer a more durable resistance. Resistance is rarely absolute, frequently, gradual levels of resistance are manifested, and even an *R* allele that is broken down by an incoming virulent pathogen mutant can display a residual resistance effect (DARSOW et al. 1987) which is a welcome contribution to the host plant's defence.

Recent research has demonstrated that *R* alleles can be stacked within one genotype, thereby increasing the level of resistance (DARSOW et al. 1987, WERNER et al. 2005, KIM et al. 2012) and extending the life time of individual effective *R* alleles. The largest effect on strength and durability of resistance would be obtained by stacking (also known as "pyramiding") of several *R* alleles that are not overcome by any virulence within the local pathogen population and that employ diverse mechanisms of resistance triggering (WOLFE and MCDERMOTT 1994, WERNER et al. 2005, TAN et al. 2010).

Plant breeders need to respond quickly and effectively to the changing virulence spectrum of important pathogens on the crops by implementing the best available and most durable resistances thereby producing up-to-date varieties in a timely manner. Frequently, there is already knowledge on a specific genetic resource's disease resistance, but the genes involved are unknown. To genetically map and isolate these genes one-by-one in large segregating populations is in most instances impermissible due to the great cost and the clumsiness of such endeavours. Therefore, detailed knowledge of the diverse *R* alleles is an important precondition in order to quickly detect, and make use of, those alleles that are responsible for a disease resistance within a given gene pool.

¹ Austrian Institute of Technology (AIT), Konrad Lorenz Straße 24, A-3430 TULLN

* Ansprechpartner: Friederike TROGNITZ, friederike.trognitz@ait.ac.at

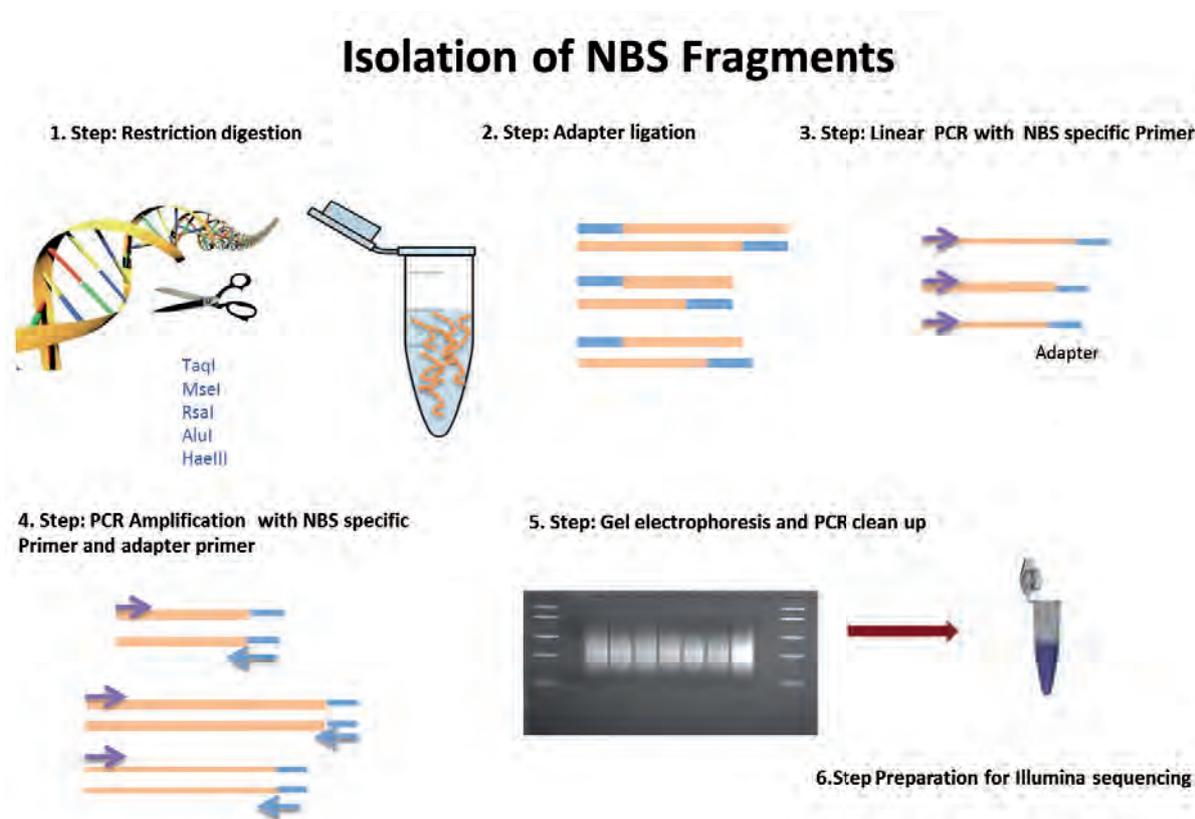


Figure 1: Workflow of next generation sequencing of a wide range of *R* allele fragments containing NBS domains, from 96 potato varieties representative of the common potato's extant *R* gene pool (VAN DER LINDEN et al. 2004). Following restriction of genomic DNA by 5 frequent-cutter enzymes and ligation of uniform adapters, the *R* alleles are isolated by linear PCR amplification using up to 15 degenerate primers. The primers were designed based on key features of the 430 *R* loci in the whole potato genome. The amplicons are size-selected in agarose gels and subjected to Illumina sequencing. The objective is to obtain up to 80-fold coverage of the potato's *R* genome.

Material and Methods

96 varieties and breeding clones were provided by 11 potato breeders. Genomic DNA was isolated with standard extraction protocols. Digestion and two-step amplification of NBS carrying *R* allele fragments (Figure 1) were employed according to the protocol of *R* gene profiling by VAN DER LINDEN et al. (2004).

Results

As a first step, PCR primers corresponding to the nucleotide binding sites (NBS) of the diverse, but well-characterized *R* gene loci published with the potato sequence (THE POTATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM 2011) were designed. The potato genome (<http://potatogenomics.plantbiology.msu.edu/index.html>) was searched for NBS. Within all NBS obtained, the amino acid sequences of the highly conserved motifs p-loop, kinase 2, and GLPL were aligned and used to design degenerate primers. Eight primers for the p-loop, 4 for kinase 2, and 3 for the GLPL motif were designed and tested for their efficiency to amplify a wide range of sequence fragments of 100 to 500 bp length.

The potato genome contains 430 NBS *R* gene loci (THE POTATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM 2011). Due to this cultivated genepool's narrow base, most loci hold 1-3 alleles, 4-allele loci are rare. Thus, we estimate that the

maximum diversity of a single variety will be represented by 1200 individual NBS fragments.

PCR amplicons truly containing NBS fragments will be prepared for sequencing by Illumina technology. The preparation includes size selection on agarose gels to eliminate very small fragments and adapter ligation for Illumina sequencing. Each variety will have one of the 24 Illumina, 6-nucleotide index tags for unequivocal identification of each variety. The samples will then be pooled and the pool divided into four sub-pools to be fed into four lanes of an Illumina flowcell. Together, the four lanes of the flowcell should produce 150 Giga bp of sequence that corresponds to an 80-fold coverage of the *R* genepool of the 96 varieties, each of them represented by average 500-bp fragments of maximum 1200 individual alleles). Currently the cost for Illumina-sequencing at 80-fold coverage compares to only one-third of the cost of 1-fold coverage by Sanger sequencing. A further advantage of the Illumina technology is the independent sequencing of single molecules, thereby making obsolete the need for cloning of fragments.

To test whether the variety-specific catalog of potato *R* alleles to be obtained by next generation sequencing we have included several varieties with known resistance genotype, such as the *R1*, *R2*, *R3* and *R4* late blight differentials. *R* allele sequences of these varieties will be searched against the cloned *R* genes like *R1*, *R2*, *R3a*, *R3b*, and *R4*. We have

further included parents and progenies from our mapping population segregating for *Rpi-adpt1* (Friederike and Bodo TROGNITZ, unpublished results). The *R* allele sequences exclusively present in all late blight resistant individuals will be mapped in the population and the location will be compared to the location of the mapped resistance.

Potato breeding and selection technology for this tetraploid heterozygous plant is lagging behind other crops due to the inaccessibility of standard genotyping techniques developed for diploid, homozygous crops. The information to be generated in the presented project on all *R* alleles will reduce this handicap. Breeders, commercial bodies interested in certified seed and food products, and scientists are highly interested in the new knowledge being generated.

Acknowledgment

This work is financed by the Austrian Science Fund (FWF), Project No TRP146, SolaRIndex.

References

- DARSOW U, GÖBEL S, GÖTZ E, OERTEL H, SCHÜLER K, 1987: R-Gene und relative Resistenz der Kartoffelknolle gegen *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Archiv Züchtungsforsch* 17: 387-397.
- JUDELSON H, 2009: Late blight. Dept Plant Pathol, Univ California, Riverside, CA [Available online: <http://oomyceteworld.net/lateblight.html>; accessed 19 Jan 2012].
- KIM HJ, LEE HR, JO KR, MORTAZAVIAN SMM, HUIGEN DJ, EVENHIUS B, KESSEL G, VISSER RGF, JACOBSEN, VOSSEN JH, 2012: Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked *R* genes. *Theor Appl Genet* 124: 923-935.
- MUN JH, YU HJ, PARK S, PARK BS, 2009: Genome-wide identification of NBS-encoding resistance genes in *Brassica rapa*. *Mol Genet Genomics* 282: 617-631.
- STRIJK PC, WIERSEMASG, 1999: Seed potato technology. Wageningen Press, Wageningen, The Netherlands.
- TAN M, HUTTEN R, VISSER R, VAN ECK, H, 2010: The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance genes *RPi-mcd1* and *RPi-ber* in potato. *Theor Appl Genet*. 121: 117-125.
- THE POTATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2011: Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475: 189-195.
- VAN DER LINDEN GC, WOUTERS D, MIHALKA V, KOCHIEVA E, VOSMAN B, 2004: Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. *Theor Appl Genet* 109: 384-393.
- WERNER K, FRIEDT F, ORDON F, 2005: Strategies for pyramiding resistance genes against the Barley Yellow Mosaic Virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2). *Mol Breed* 16: 45-55.
- WOLFE MS, MCDERMOTT JM, 1994: Population genetics of plant pathogen interactions: the example of the *Erysiphe graminis-Hordeum vulgare* pathosystem. *Annu Rev Phytopathol* 32: 89-113.

Note: The online version of the proceedings includes the figure in colour. It can be downloaded either from the homepage of the meeting (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/> - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchtertagung - Saatzüchtertagung 2011) or requested from the corresponding author.

Transcriptomic characterization of *Fusarium* resistance QTL *Fhb1* and *Qfhs-ifa.5A* in wheat near-isogenic lines

Wolfgang Schweiger^{1*}, Barbara Steiner¹, David P. Kreil², Franz Berthiller³,
Marc Lemmens¹, Gary J. Muehlbauer⁴ and Hermann Buerstmayr¹

Abstract

Fusarium head blight (FHB) is a devastating disease on wheat leading to severe losses in yields and grain quality. Resistance to the causative fungus *Fusarium graminearum* is constituted by the effect of multiple quantitative trait loci (QTL). In an effort to identify genetic determinants underlying two validated resistance QTL to *F. graminearum* in wheat, *Qfhs.ndus-3BS* (syn. *Fhb1*) and *Qfhs.ifa.5A*, we generated NILs from a cross of the susceptible spring wheat cultivar Remus and the QTL donor line, the highly resistant CM82036, a descendant of Sumai3×Thornbird. Four NILs from a BC5F2 population were selected for the presence of either QTL resulting in NIL1 harboring both QTL, NIL2 (*Fhb1*), NIL3 (*Qfhs.ifa.5A*) and NIL4 (no QTL). We investigated differences in gene expression levels related to treatment, genotype, QTL and time point from three individual replicates using the Affymetrix 44k wheat GeneChip. Probe set contrasts were calculated for *Fusarium* challenged and constitutive expression differences caused by *Fhb1* or *Qfhs-ifa.5A*. In total, we identified 631 transcripts responding to *Fusarium* stress when calculating the average expression change between mock and *Fusarium* inoculated samples of all five investigated genotypes ($P \leq 0.05$, fold change ≥ 2). The vast majority of transcripts (625) were only detected 72 hai, less at 24 hai (48) and only few at 8 hai (18). 322 of the *Fusarium* responsive probe sets were ge-

notype independent and higher expressed in all *Fusarium* infected lines. QTL specific contrasts were calculated by subtracting the *Fusarium* responsive background from NIL4 (no QTL) from the *Fusarium* responsive transcripts observed in single QTL NILs: 72 hai 339 genes were up-regulated in lines lacking the resistance conferred by *Qfhs-ifa.5A* but only one in presence of *Qfhs-ifa.5A*. Ten genes are higher expressed in absence of *Fhb1* and one in presence of *Fhb1*. 54 transcripts exhibit constitutive expression differences for *Fhb1*. Thereof 17 genes are higher expressed in presence of *Fhb1*. Among others these encode for an extensin-like cell wall protein and a wax synthase which may contribute to resistance. 28 genes were constitutively higher and 63 less expressed when comparing only the mock-inoculated samples in genotypes differing in *Qfhs.ifa.5A*. Of 16 probe sets corresponding to defense related genes, we identified three heat shock protein 20 that are significantly more expressed. Among the defense related genes showing the highest fold changes we found a lipid-transfer protein at least 51× higher expressed in the *Qfhs-ifa.5A* lines and a MDR-like ABC transporter, which is a least 2× higher expressed.

Keywords

Affymetrix GeneChip, *Fusarium* head blight, near-isogenic lines, *Triticum aestivum*

Acknowledgments

This work was funded by the FWF (Austrian Science Fund), projects #P16724-B05, #F3711-B11.

References

- BUERSTMAYR H, LEMMENS M, HARTL L, DOLDI L, STEINER B, STIERSCHNEIDER M, RUCKENBAUER P, 2002: Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). *Theor Appl Genet* 104: 84-91.
- BUERSTMAYR H, STEINER B, HARTL L, GRIESSER M, ANGERER D, LENGAUER D, MIEDANER T, SCHNEIDER B, LEMMENS M, 2003: Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theor Appl Genet* 107: 503-508.
- STEINER B, KURZ H, LEMMENS M, BUERSTMAYR H, 2009: Differential gene expression of related wheat lines with contrasting levels of head blight resistance after *Fusarium graminearum* inoculation. *Theor Appl Genet* 118: 753-764.

¹ Institute for Biotechnology in Plant Production, Department IFA-Tulln, University of Natural Resources and Life Sciences, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

² Chair of Bioinformatics, Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Life Sciences, Muthgasse 18, A-1190 VIENNA

³ Christian Doppler Laboratory for Mycotoxin Metabolism, Department IFA-Tulln, University of Natural Resources and Life Sciences, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

⁴ Department of Agronomy and Plant Genetics, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, USA

* Ansprechpartner: Wolfgang SCHWEIGER, wolfgang.schweiger@boku.ac.at

Entwicklung eines auf Mikrosatelliten basierenden Nachweissystems zur Differenzierung von Gerstensorten

Development of a microsatellite-based detection system for the differentiation of barley varieties

Jun Wang^{1,2}, Verena Peterseil^{1*}, Helmut K. Mayer² und Rupert Hohegger¹

Abstract

This document presents a Quadruplex-PCR targeting microsatellites for the differentiation of barley varieties. It can be seen as an alternative to the proposed SDS-PAGE of the hordeins of barley as proposed in UPOV tg/19/10, or be used as a complement to other differences in morphological or physiological characteristics. The advantage of this method in comparison to morphological or physiological traits is the considerable shorter time of analysis. Within a few days, a clear distinction can be made. DNA of single barley kernels was extracted, analysis of microsatellites by using Multiplex-PCR was performed, and finally these microsatellites were separated by gel electrophoresis. The microsatellite pattern of each barley variety can be seen as a fingerprint thereof and so be used for molecular biological differentiation of barley varieties.

Keywords

Differentiation of varieties, *Hordeum vulgare*, microsatellites

Einleitung

Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ist als viertwichtigstes Getreide weltweit bekannt (SCREENIVASULU et al. 2008). Sie wird verwendet als Futtermittel und zur Herstellung von Malz und Malzextrakt, welche hauptsächlich für die Bierproduktion, aber auch in anderen Bereichen der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden. Malz- und in der Folge Bierqualität sind sortenabhängig und verlangen somit bei reinsortiger Verwendung bzw. bei von mehreren Sorten einen entsprechenden Herstellungsprozess (LIN et al. 2007) weshalb die Frage der Sortenauswahl bzw. in weiterer Hinsicht jene der Sortenreinheit sowie -bestimmung von großer Bedeutung ist.

Zur Sortendifferenzierung kann laut UPOV (Internationaler Verband zum Schutz von Pflanzzüchtungen; www.upov.org) die SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacryl Amide Gel Electrophoresis) der Hordeinfraktionen als Sortencharakteristikum herangezogen werden. Es wird

allerdings darauf hingewiesen, dass dieses Merkmal für sich alleine nicht ausreichend ist. Bei sehr nahe verwandten Gerstensorten wie zum Beispiel Geschwistern, kann es vorkommen, dass diese nicht anhand von Proteinmustern unterschieden werden können. In diesem Fall können die morphologischen und physiologischen Merkmale der Gerste laut DUS-Prüfung (UPOV 1994) herangezogen werden oder - wenn zum Auswuchs der Pflanze nicht die benötigte Zeit vorhanden ist - eine molekularbiologische Methode basierend auf DNA-Analyse (molekulare Marker) angewendet werden.

Molekulare Marker sind kurze DNA-Abschnitte, die eine eindeutige Identifizierung von Organismen erlauben. Als molekulare Marker eignen sich DNA-Abschnitte die mit Hilfe diverser DNA-Techniken analysiert werden können (beispielsweise RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphisms*; AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphisms*; RAPD, *Randomly Amplified Polymorphic DNA*). Mikrosatelliten sind DNA-Abschnitte, die sich aus wiederholten Motiven zusammensetzen (HAMADA et al. 1982, LITT und LUTY 1989), die Motive sind 1-6 bp groß, z.B. (G)_n, (AT)_n oder (GATA)_n. Diese unterscheiden sich in der Anzahl der Wiederholungen (Längenpolymorphismus). Diese Mikrosatelliten- (SSR, *Simple Sequence Repeats*) Marker weisen einen sehr hohen Polymorphiegrad auf (AKKAYA et al. 1992, WU und TANKSLEY 1993, BELL und ECKER 1994, PLASCHKE et al. 1995, STRUSS und PLIESKE 1998) und eignen sich daher gut zur Sortendifferenzierung.

Ziel dieser Arbeit war es für spezielle Gerstensorten, die anhand der SDS-PAGE der Hordeine nicht eindeutig unterscheidbar sind, ein System zur Unterscheidung mittels molekularbiologischer Analyse zu entwickeln, besonders wenn dies innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne erforderlich ist - im Gegensatz zur DUS-Prüfung, welche unter Umständen eine ganze Wachstumsperiode dauern kann.

Material und Methoden

Für die Arbeit wurden 15 Gerstensorten ausgewählt die im jeweiligen Hordein-Elektropherogramm keine oder nur sehr geringe Unterschiede aufweisen. Die Differenzierung anhand von Mikrosatelliten erfolgte in drei Etappen:

¹ Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

² Universität für Bodenkultur, Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, Muthgasse 11, A-1190 WIEN

* Ansprechpartner: Verena PETERSEIL, verena.peterseil@ages.at

(1) Extraktion der Gersten-DNA aus Einzelkörnern, (2) Amplifizierung der Mikrosatelliten mittels PCR (*Polymere Chain Reaction*), (3) Auftrennung der Mikrosatelliten mittels Elektrophorese. Zur Verifizierung der erfolgreichen Extraktion bzw. PCR wurde anschließend an den jeweiligen Arbeitsschritt eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Das Sichtbarmachen der Mikrosatelliten in Form definierter Banden auf einem Gel erlaubt es, einer bestimmten Sorte einen spezifischen Fingerprint zuzuordnen und somit ein eindeutiges Unterscheidungsmerkmal zu erhalten.

Extraktion der DNA

Die einzelnen Gerstenkörner wurden mit einer Zange zerquetscht und anschließend jeweils separat dem Extraktionsprozess unterworfen. Die Messung der DNA-Ausbeute erfolgte mittels UV-Photometer. Die Bestimmung der DNA-Ausbeute ist von Bedeutung, um die Konzentration der DNA-Arbeitslösung bei der im Folgenden durchgeführten Amplifikation der Mikrosatelliten optimal einstellen zu können.

Amplifizierung der Mikrosatelliten mittels PCR

Anhand von Literaturrecherchen wurden 17 potentielle Mikrosatelliten ausgewählt, die in Single-PCRs separat ausgetestet wurden. 4 speziell ausgewählte Mikrosatelliten-PCRs wurden anschließend zu einer Multiplex-PCR zusammengelegt. Folgende Charakteristika waren für die Auswahl der Mikrosatelliten-PCRs ausschlaggebend:

(i) PIC-Wert (*Polymorphismus Information Content*): Der PIC-Wert ist ein Maß für den Polymorphiegrad und hat Aussagekraft zur Differenzierung zwischen Populationen und Individuen (BOTSTEIN et al. 1980) und wird nach folgender Formel berechnet:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

wobei PIC_i der Polymorphic Information Content von Marker i ist und P_{ij} die Häufigkeit des Allels j des Marker i über die gesamte Probenzahl.

(ii) Erwartete Produktgrößen (der Mikrosatelliten): Im Hinblick auf das Multiplexen ist es von Vorteil, wenn die einzelnen Mikrosatelliten der Single-Reaktionen genügend große Unterschiede in der Produktgröße haben, damit sie im Zuge der elektrophoretischen Auftrennung deutlich abgegrenzte Bereiche darstellen und einander nicht überlappen und dadurch die Auswertung beeinträchtigen.

(iii) Annealing-Temperatur der Single-Reaktionen: Auch im Hinblick auf das anschlie-

bende Multiplexen ist es von Vorteil, wenn die Annealing-Temperaturen in einem ähnlichen Bereich liegen

(iv) Verteilung der Mikrosatelliten im Genom

(v) Interaktionen beim Multiplexen: Da beim Multiplexen mehrere Reaktionen nebeneinander stattfinden, kann es vorkommen, dass diese Reaktionen einander beeinflussen. Sie können einander beeinträchtigen bzw. gänzlich stören, sodass eine Single-Reaktion gar nicht stattfindet, oder die Produktgrößen nicht den Erwartungen entsprechen.

Im Hinblick auf das Elektrophorese-Detektionssystem wird bei der PCR neben dem Forward- und Reverse-Primer ein zusätzlicher M13-Primer, welcher mit einem speziellen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, integriert. Dieser Farbstoff fluoresziert bei genau der Wellenlänge, mit der das Elektrophoresesystem die aufgetrennten Amplifikate detektiert. Als M13 bezeichnet man eine Sequenz eines Phagen, die hier als Träger des Fluoreszenzfarbstoffes dient. Im Zuge der PCR wird der markierte M13-Primer während der Zyklen in die Produkte eingearbeitet. Die Markierung hat den Vorteil, dass die Proben vor der elektrophoretischen Auftrennung nicht vorbehandelt oder vorgereinigt werden müssen.

Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die mit Gel-Ladepuffer versehenen Proben sowie ein Größenstandard werden auf einem Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung erfolgt online mittels Laser. Die Laser-Wellenlänge entspricht jener des bei der PCR verwendeten Farbstoffes, somit werden nur markierte Produkte erfasst. Die Detektion erfolgt online mittels Laserscan, so entsteht ein Elektropherogramm anhand dessen die Auswertung vorgenommen werden kann. Aufgrund der Quadruplex-Reaktion werden 4 Bereiche erwartet in denen Banden zu sehen sind (*Abbildung 1*).

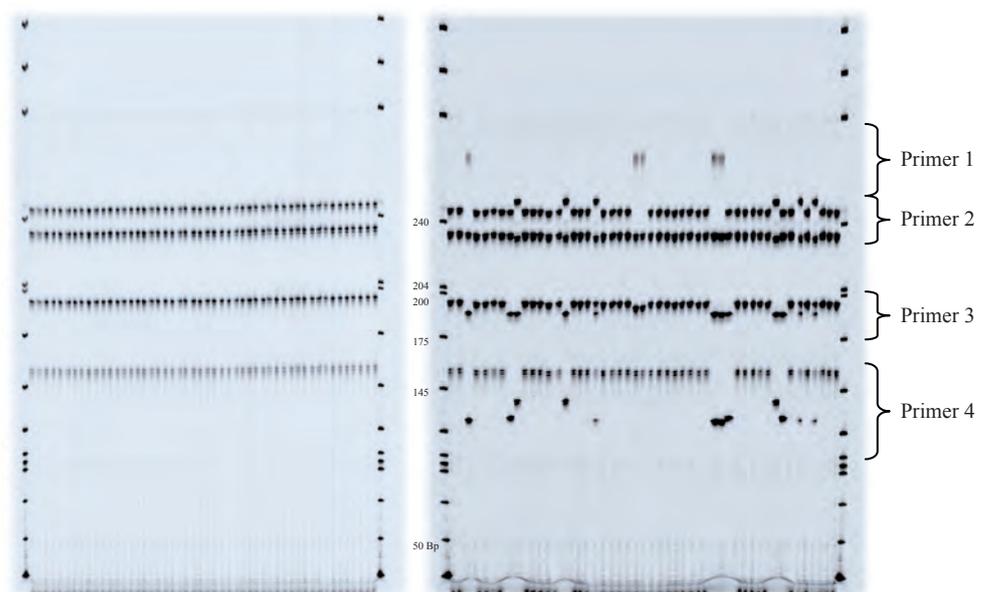


Abbildung 1: Elektrophorese von Körnern der Sorte Breunskylyie (links) sowie von einer 50 Korn Probe (rechts)

Figure 1: Electrophoresis of 50 kernels of barley variety Breunskylyie (left) and a 50 kernels sample of different varieties (right)

Ergebnisse

In *Abbildung 1* ist das Elektropherogramm der Sorte Breunskylije sowie einer 50-Korn Probe zu sehen. Die Fingerprints von Breunskylije sind untereinander identisch, die 50 Proben entsprechen derselben Sorte während es sich bei der 50-Korn Probe offensichtlich um ein Gemisch von mehreren Sorten handelt.

Zusammenfassung

Diese Methode, basierend auf DNA-Mikrosatelliten, dient zur Unterscheidung diverser Gerstensorten.

Sie kann als molekularbiologische Alternativmethode zur in der TG/19/10 (UPOV 1994) vorgeschlagenen SDS-PAGE betrachtet werden. Sollte ein Unterschied innerhalb eines sehr kurzen Zeitraums (Tage) notwendig sein, kann diese Methode angewendet werden. In Anbetracht der relativ kurzen Analysendauer - im Gegensatz zur Beobachtung der morphologischen Eigenschaften der Gerstenpflanze im Zuge des Anbaus bzw. der Prüfung der physiologischen Eigenschaften im Zuge des Wachstums - erhält man mit dieser DNA-basierenden Methode ein zufriedenstellendes Ergebnis innerhalb von wenigen Tagen. Weitere Anwendungen können sich auch im Zuge von Sortenreinheitsprüfungen ergeben oder auch bei Verwechslungen von bekannten Saatgutchargen, wobei die betreffenden Sorten wieder dem Saatgut zugeordnet können werden.

Literatur

AKKAYAMA S, BHAGWAT AA, CREGAN PB, 1992: Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131-1139.

BELL CJ, ECKER JR, 1994: Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 19: 137-144.

BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLNICK M, DAVIS RW, 1980: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.

HAMADA H, PETRINO MG, KAKUNAGAT, 1982: A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukariotic genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6465-6469.

LIN Y, LIAO M, YANG G, YU W, GUAN H, FAN W, DONG J, 2007: Identification of barley Varieties used in beer production by microsatellite DNA markers. *J Am Soc Brew Chem* 65: 47-51.

LITT M, LUTY JA, 1989: A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44: 397-401.

PLASCHKE J, GANAL MW, RÖDER MS, 1995: Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 91: 1001-1007.

SREENIVASULU N, GRANER A, WOBUS U, 2008: Barley genomics: an overview. *Int J Plant Genomics* 2008: 486258 (DOI 10.1155/2008/486258).

STRUSS D, PLIESKE J, 1998: The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor Appl Genet* 97: 308-315.

UPOV, 1994: Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability: Barley (*Hordeum vulgare* L. *sensu lato*). Test guideline TG/19/10. International Union for the Protection of New Varieties of Plants, Geneva, Switzerland.

WU KS, TANKSLEY SD, 1993: Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet* 241: 225-235.

GMO Screening in Saatgut - 8 aus 53? GMO screening in seeds - 8 out of 53?

Andreas Firzinger^{1*}

Abstract

Since 2001 Austrian authorities perform a monitoring of seeds of certain plants for their content of genetically modified organisms (GMO). Technical specifications for sampling of seeds and methods for detection of GMOs are defined in official policies and guidelines. The permanent monitoring should keep the GMO contamination of seeds below a limit of 0.1%, which is the limit for labelling seeds as GMOs. Laboratories performing GMO screening in seeds should be able to detect one approved or not approved transgenic seed among 3000 other not genetically modified seeds with a probability of 95%. In 2001 about 20 transgenic maize lines were registered worldwide and by screening for two DNA sequences all of them could be detected. Nowadays, more than 50 transgenic maize lines are registered and a screening of four DNA sequences is necessary to detect all transgenic maize varieties. Besides maize several other plant species are included in the policy for labelling of transgenic seeds, i.e. soybean, Polish and Argentine canola, tomato, potato and chicory. All or a combination of the following DNA sequences should be detected in a GMO screening of seeds: CaMV 35S promotor, *Nos*-promotor, *Nos*-terminator, *PAT* genes from *Streptomyces viridochromogenes* and *S. hygroscopicus*, and the *CP4 EPSPS* gene. Additionally, several event-specific PCR methods should be applied, which detect only a single transgenic plant, because some transgenics do not contain any of the above mentioned DNA sequences. The number of approvals for transgenic plants rises continuously and so does the number of DNA sequences, which have to be detected for an efficient GMO screening.

Keywords

Genetic engineering, genetically modified organism, labelling, screening, transgenic seeds

Einleitung

Im Jahr 2001 wurde in Österreich die Saatgut-Gentechnik-Verordnung (BGBl. II Nr. 478/2001) erlassen. Mit dieser Verordnung wurde erstmals festgelegt, dass Saatgut, welches nicht gentechnisch verändert ist, in der Erstuntersuchung mit GMO-Saatgut nicht verunreinigt sein darf. In einer Nachkontrolle der Saatgutverkehrskontrolle darf GMO-Saatgut bis zu 0,1% in nicht gentechnisch verändertem Saatgut vorkommen. Zum Zeitpunkt des Erlasses der

Verordnung waren knapp über 20 gentechnisch veränderte Maislinien zugelassen. Zehn Jahre später, Ende 2011, sind bereits mehr als 50 Maislinien zugelassen. Während damals die Detektion von lediglich zwei DNA-Sequenzen notwendig war, um das Vorhandensein einer GMO-Maislinie in Maissaatgut nachzuweisen bzw. auszuschließen, hat sich bis Ende 2011 nicht nur die Zahl der zugelassenen GMOs sondern auch die Zahl der zu detektierenden DNA-Sequenzen erhöht um ein umfassendes GMO-Screening in Mais zu gewährleisten. Die Saatgut-Gentechnik-Verordnung betrifft neben Mais seit 2011 noch weitere 8 Arten: Kohlrübe (*Brassica napus* L. var. *napobrassica*), Raps (*B. napus* L.), Rübsen (*B. rapa* L.), Stoppel-, Herbst-, Mairübe (*B. rapa* L. var. *rapa*), Sojabohne (*Glycine max* (L.) Merr.), Tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) als Verarbeitungssorten, Zichorie (*Cichorium intybus* L.), Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) (BGBl. II Nr. 76/2011) (BUNDESKANZLERAMT 2012a).

Material und Methoden

Probenvorbereitung und -beschaffenheit

Für alle in der Saatgut-Gentechnik-Verordnung erwähnten Arten gelten die gleichen Anforderungen an die Probenvorbereitung und Untersuchungsmethodik, welche in den Methoden für Saatgut und Sorten gemäß § 5 Saatgutgesetz 1997 festgelegt sind (BUNDESKANZLERAMT 2012b). Bei der Probenvorbereitung ist darauf zu achten, dass die Saatgutbehandlung (z.B. Beizung, Inkrustierung, Pillierung) und äußere Verunreinigungen der Samen, welche das Ergebnis der Untersuchung von Saatgut auf Verunreinigungen mit zugelassenen und nicht zugelassenen GMO beeinflussen könnten, auszuschließen sind. So kann z.B. Stärke, welche bei Beizmitteln eingesetzt wird, aus GMO-Mais gewonnen worden sein und würde in diesem Fall zu einem positiven Ergebnis im GMO-Screening führen, obwohl das Saatgut selbst keine GMOs enthält. Die Arbeitsprobe im Labor muss zumindest 3000 Samen umfassen und die Untersuchungsmethodik und der Untersuchungsplan müssen so ausgelegt sein, dass ein gentechnisch veränderter Same unter 3000 nicht gentechnisch veränderten Samen mit einer 95%igen Sicherheit nachgewiesen werden kann (BUNDESAMT FÜR ERNÄHRUNGSSICHERHEIT 2010). Eine Ausnahme bildet hier das Kartoffelsaatgut, schon alleine aufgrund der Größe des Pflanzguts. Bei der Kartoffel muss die Arbeitsprobe im Labor zumindest 200 Knollen umfassen (BUNDESAMT FÜR ERNÄHRUNGSSICHERHEIT 2011).

¹ Romer Labs Diagnostic GmbH, Technopark 1, A-3430 TULLN

* Ansprechpartner: Andreas FIRZINGER, andreas.firzinger@romerlabs.com

Methoden

Bei der Auswahl der Methodik hat sich die Untersuchung der DNA der Arbeitsprobe mittels PCR als am besten geeignet herausgestellt. Methoden, die auf der Untersuchung von transgenen Proteinen basieren, sind aus verschiedenen Gründen zu wenig sensitiv. Während sich zum Beispiel der DNA-Gehalt bei Saatgut bei längerer Lagerung kaum verändert, werden Proteine in den Zellen entweder abgebaut oder nicht exprimiert, da sich der Same bis zur Keimung in einem Ruhestadium befindet und der Stoffwechsel auf ein absolutes Minimum reduziert ist. Außerdem sind einige der gesuchten GMOs in der Zusammensetzung des Proteoms von anderen, nicht modifizierten Organismen der gleichen Spezies nicht oder nur unter großem apparativem Aufwand unterscheidbar. Wie viele und welche DNA-Sequenzen beim Screening nach zugelassenen und nicht zugelassenen GMOs erfasst werden, sodass den Anforderungen der österreichischen Saatgut-Gentechnik-Verordnung entsprochen wird, ist von Art zu Art unterschiedlich. Viele der eingesetzten PCR-Methoden sind auf der Homepage des European Union Reference Laboratory for GM Food & Feed (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>) publiziert.

Mais

Von den mehr als 140 GMOs in der Datenbank des amerikanischen Center for Environmental Risk Assessment stellen die GMO-Maislinien den größten Anteil dar. Ende 2011 waren insgesamt 54 Maislinien in den Datenbanken registriert (CERA 2011, FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE 2011). Einen Großteil dieser Linien kann man durch Detektion des 35S-Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) und des *Nos*-Terminators aus *Agrobacterium tumefaciens* erfassen (Tabelle 1). Vier der nicht erfassten Maislinien sind aus somaklonalen Mutationen hervorgegangen und würden in Österreich nicht als GMOs gelten. Die verbleibenden zwei nicht erfassten Maislinien DP-Ø9814Ø-6 (Event 98140) und REN-ØØØ38-3 (LYØ38) müssen mit jeweils einer PCR-Methode detektiert werden. Somit werden durch Detektion von insgesamt 4 DNA-Sequenzen alle bis 2011 bekannten GMO-Maislinien, exklusive der durch somaklonale Mutation gezüchteten Sorten, erfasst.

Raps, Kohlrübe, Rübsen, Stoppel-, Herbst- und Mairübe

Obwohl Raps, Rübsen und Rüben in der Saatgut-Gentechnik-Verordnung getrennt geführt werden, kann man diese Arten bei Überlegungen zum GMO-Screening zusammenfassen. Zwanzig Linien sind in Datenbanken (CERA 2011, FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE 2011) registriert, davon auch insgesamt drei, die mittels Mutagenese und somaklonaler Mutation gezüchtet wurden. Für ein GMO-Screening in diesen Arten ist die Detektion von 5 DNA-Sequenzen notwendig: 35S-Promotor, *Nos*-Promotor aus *A. tumefaciens*, die Gene für Phosphinothricin N-Acetyltransferase aus *Streptomyces hygroscopicus* (*bar*) und *S. viridochromogenes* (*pat*) und das Gen für 5-Enolpyruvyl Shikimat-3-Phosphat Synthase aus *A. tumefaciens* CP4 (*CP4 EPSPS*) (Tabelle 1). Alle diese Arten gehören zur Familie der *Brassicaceae* und

sind relativ häufig mit dem Blumenkohlmosaikvirus infiziert. Da der 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus stammt, führt die Detektion des 35S-Promotors einer mit diesem Virus infizierten Pflanze zu einem positiven Screeningergebnis, das aber erst durch weitere Untersuchungen bestätigt oder entkräftet werden kann. Ein falsch positives Screeningergebnis ist erst dann ein solches, wenn andere DNA-Sequenzen des Blumenkohlmosaikvirus in der Probe nachgewiesen und all jene GMO-Linien, die den 35S-Promotor enthalten, nicht nachgewiesen werden konnten.

Sojabohne

Im Jahr 1994 wurde in den USA die erste GMO-Sojalinie zugelassen, GTS 40-3-2 von Monsanto, besser bekannt unter dem Namen Roundup Ready® Sojabohne. Diese Sojalinie war kommerziell mindestens ebenso erfolgreich, wie das Betriebssystem Windows auf dem Softwaremarkt. Über viele Jahre hinweg dominierte die Roundup Ready® Sojabohne den Weltmarkt im GMO-Soja Bereich. Dies ist vielleicht der Grund dafür, dass bis Ende 2011 lediglich 17 GMO-Sojalinien (CERA 2011, FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE 2011) zugelassen oder zur Zulassung eingereicht wurden. Ein noch ausreichendes GMO-Screening in Soja-saatgut ist durch Detektion der folgenden DNA-Sequenzen möglich: 35S-Promotor, *CP4 EPSPS* Gen, BPS-CV127-9 Soja, DP-305423 Soja, DP-356043 Soja (Tabelle 1). Die letzten 3 Methoden detektieren jeweils nur eine Sojalinie, es handelt sich hierbei um sogenannte Event-spezifische Methoden, mit welchen immer nur genau eine einzelne GMO-Linie detektiert werden kann. Bei Soja zeigt sich der Trend am deutlichsten, dass neuere GMO-Linien keine gemeinsamen transgenen Elemente mehr haben, weshalb für jede einzelne Linie ein eigenes PCR Verfahren entwickelt werden muss. Von 4 weiteren in der Zulassung stehenden GMO-Sojalinien ist für jede ein eigenes PCR-Verfahren zur Detektion nötig.

Kartoffel

In den USA wurde die erste gentechnische Kartoffel im Jahr 1994 zugelassen (CERA 2011), elf Jahre später wurde von BASF ein Antrag zur Zulassung einer gentechnisch veränderten Kartoffel mit veränderter Stärkezusammensetzung in Europa eingereicht. Nachdem der Anbau dieser Kartoffel 2010 erlaubt wurde, verkündete BASF kürzlich, die Entwicklung und Vermarktung gentechnisch veränderter Pflanzen, die hauptsächlich auf den europäischen Markt abzielen, einzustellen und sich auf die Wachstumsmärkte außerhalb Europas zu konzentrieren (BASF 2012), was letztlich das Ende des Anbaues dieser Kartoffel in Europa bedeutet. Für ein GMO-Screening in Kartoffelsaatgut bleibt die Amflora Kartoffel trotzdem relevant, wie auch sechs weitere Linien (CERA 2011, FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE 2011). Um alle diese Kartoffellinien zu erfassen, muss man mindestens zwei DNA-Sequenzen detektieren: 35S-Promotor und *Nos*-Terminator (Tabelle 1). Eine PCR-Methode zur Detektion der AM1020-4 Kartoffel, welche weder den 35S-Promotor noch den *Nos*-Terminator enthält, wurde bereits von Laboratorien der EU Kommission validiert und wird in Bälde publiziert. Ab der Publikation des Verfahrens muss dieses ebenfalls beim Screening angewandt

werden. Die Probengröße bei der Kartoffel wurde auf 200 verringert, wobei eine Laborprobe dieser Größe immer noch eine Herausforderung bezüglich Probenvorbereitung darstellt. Dazu kommt noch, dass Kartoffelpflanzgut mit Bodenbakterien behaftet sein kann, welche zu falsch positiven Ergebnissen im Screening führen können.

Tomate

Die Zahl der GMO-Tomatensorten hält sich in Grenzen, seit dem Jahr 2000 gibt es keine bekannten neuen Entwicklungen (CERA 2011). Somit sind seit dem Inkrafttreten der Saatgut-Gentechnik-Verordnung lediglich zwei DNA-Sequenzen für ein GMO-Screening zu detektieren: 35S-Promotor und *Nos*-Promotor (Tabelle 1). Damals, wie heute, ist die erforderliche Anzahl an Samen für die Untersuchung ein Kostenhindernis für den Antragsteller, da ein Tomatensamen ungleich wertvoller ist, als z.B. eine Sojabohne.

Zichorie

Eine GM-Zichoriensorte (RM3-3, RM3-4, RM3-6 zugelassen 1996 in der EU und 1997 in den USA) wurde bisher zugelassen. Weitere Anträge zur Zulassung von GM-Zichoriepflanzen wurden in den OECD-Staaten nicht eingereicht (CERA 2011, FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE 2011). Um diese Pflanze zu detektieren ist somit nur eine von mehreren PCR-Methoden notwendig: *Nos*-Terminator oder *Nos*-Promotor (Tabelle 1).

Weizen und Zuckerrübe

Das Saatgut beider Arten wird von der Saatgut-Gentechnik-Verordnung nicht berührt und es wird, wie aus dem jährlichen GVO-Monitoring Bericht (LEONHARDT et al. 2010) hervorgeht, bezüglich GMO nicht von staatlichen Institutionen überwacht. Dennoch sollen die Arten der Vollständigkeit halber erwähnt werden. In der CERA-Datenbank sind insgesamt 7 GM-Weizenlinien registriert (CERA

2011), aber nur eine davon ist tatsächlich transgen. Alle anderen Weizenlinien wurden durch Selektion gezüchtet und sind resistent gegen Imidazol. Die verbleibende GM-Weizenlinie MON71800 kann wie schon zuvor die Zichorie durch Anwendung einer von mehreren PCR-Methoden nachgewiesen werden: 35S-Promotor, *Nos*-Terminator oder *CP4 EPSPS* (Tabelle 1). Bei der Zuckerrübe sind alle 4 in den Datenbanken registrierten GM-Linien auch transgen (CERA 2011, FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE 2011). Mit der Detektion von zwei DNA-Sequenzen wäre ein GMO-Screening möglich: 35S-Promotor und *CP4 EPSPS* (Tabelle 1).

Ausblick

Die Zahl der neu entwickelten GMOs ist, vor allem außerhalb Europas, im Steigen begriffen, auch wenn die Zulassung einiger GMOs mittlerweile abgelaufen ist und nicht mehr verlängert wurde. In einem GMO-Screening müssen auch solche GMOs erfasst werden, die schon seit Jahren nicht mehr angebaut oder vermarktet werden, wie sich im Lebensmittelbereich im Falle der FP967 Leinsaatlinie (CDC-FLØØ1-2) gezeigt hat. Obwohl der Anbau in Kanada im Jahr 2001 eingestellt wurde um den Exportmarkt in die EU nicht zu gefährden, tauchten im Jahr 2009 einige Leinsaatlieferungen in Europa auf, die Kontaminationen mit eben jener GMO-Leinsaat enthielten. Dies wurde manchmal erst bemerkt, als diverse Endprodukte, wie z.B. Backwaren, im Rahmen der Qualitätskontrolle auf GMOs hin untersucht wurden. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde aus Kanada importierte Leinsaat nicht auf GMO-Kontaminationen hin untersucht.

Bei neu entwickelten GMOs zeigt sich der Trend, dass bisher eingesetzte PCR-Methoden (Tabelle 1) für ein Screening nicht mehr ausreichend sind, da die GMOs oft vollkommen neue Regulationssequenzen und Transgene beinhalten und Selektionsmarker, wie z.B. Herbizidresistenzen, durch Kreuzungen entfernt werden können (z.B. MON87701 und MON87708 Soja). Bei der Antragstellung muss der Produ-

Tabelle 1: Kulturarten und DNA-Sequenzen für GMO-Screening
Table 1: Plant species and DNA-sequences for GMO screening

Kulturart	DNA Sequenzen ¹						Eventspezifische Methoden	PCR-Methoden	GMO-Linien ²	
	35S-P	<i>Nos</i> -P	<i>Nos</i> -T	<i>CP4 EPSPS</i>	<i>bar</i>	<i>pat</i>			detektiert	nicht detektiert
Mais	×		×				LY038 DP98140	4	50	1
Soja	×			×			DP305423 DP356043 BPS CV127 9	5	11	6
Raps, Rübsen u.a. Brassicaceen	×	×		×	×	×		5	17	0
Kartoffel	×		×				AM04-1020	3	7	0
Tomate	×	×						2	6	0
Zichorie			×					1	1	0
Weizen	×							1	1	0
Zuckerrübe	×			×				2	4	0

¹ 35S-P: 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV); *Nos*-P: *Nos*-Promotor aus *Agrobacterium tumefaciens*; *Nos*-T: *Nos*-Terminator aus *A. tumefaciens*; *CP4 EPSPS*: 5-Enolpyruvyl Shikimat-3-Phosphat Synthase aus *A. tumefaciens* *CP4*; *bar*: Phosphinothricin N-Acetyltransferase aus *Streptomyces hygroscopicus*; *pat*: Phosphinothricin N-Acetyltransferase aus *S. viridochromogenes*

² nur tatsächliche transgene Linien berücksichtigt (keine Mutationslinien)

zent eine PCR-Methode zur Detektion des GMOs beilegen, jedoch sind diese Methoden nicht für ein Screening geeignet, da sie spezifisch sein müssen und keine anderen GMOs und Pflanzenlinien detektieren dürfen. Die Komplexität des GMO-Screenings im Saatgut wird zunehmen und die Zukunft wird immer neue Herausforderungen sowie überraschende Ergebnisse in der GMO-Analytik bereithalten.

Literatur

- BASF, 2012: BASF konzentriert Pflanzenbiotechnologie-Aktivitäten auf Hauptmärkte in Nord- und Südamerika. Presse-Information P109/12, 16. Jan 2012, BASF SE, Ludwigshafen [Internet: <http://www.basf.com/group/pressemitteilungen/P-12-109>; verifiziert 28 Jan 2012].
- BUNDESAMT FÜR ERNÄHRUNGSSICHERHEIT, 2010: Anforderungen an die Beschaffenheit und Methoden zur Bestimmung der Beschaffenheit von Saatgut. Amtliche Nachrichten 14/2010 [Internet: <http://www.baes.gv.at/amtliche-nachrichten/kundmachungen/saatgut-gesetz/>; verifiziert 28 Jan 2012].
- BUNDESAMT FÜR ERNÄHRUNGSSICHERHEIT, 2011: Normen und Verfahren zur Anerkennung von Kartoffelpflanzgut. Amtliche Nachrichten 13/2011 [Internet: <http://www.baes.gv.at/amtliche-nachrichten/kundmachungen/saatgutgesetz/>; verifiziert 28 Jan 2012].
- BUNDESKANZLERAMT, 2012a: Gesamte Rechtsvorschrift für Saatgut-Gentechnik-Verordnung. Bundeskanzleramt Rechtsinformationssystem [Internet: <http://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=20001731>; verifiziert 28 Jan 2012].
- BUNDESKANZLERAMT, 2012b: Gesamte Rechtsvorschrift für Saatgutgesetz 1997. Bundeskanzleramt Rechtsinformationssystem [Internet: <http://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10011033>; verifiziert 28 Jan 2012].
- CERA, 2011: GM Crop Database. Center for Environmental Risk Assessment, International Life Sciences Institute Research Foundation, Washington DC. [Internet: http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database; verifiziert 31 Dec 2011].
- FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE, 2011: Gentechnisch veränderte Pflanzen, Lebens- und Futtermittel: Zulassungen in der EU. TransGen Datenbank, Verein zur Förderung der gesellschaftlichen Diskussionskultur, Aachen [Internet: <http://www.transgen.de/zulassung/gvo/>; verifiziert 31 Dec 2011].
- LEONHARDT C, HARTMANN J, ZIMMERMANN H, HOCHEGGER R, 2010: Endbericht über das Monitoring einer möglichen Verunreinigung mit zugelassenen und nicht zugelassenen Gentechnisch Veränderten Organismen (GVO) gemäß GVO Überwachungs- und Monitoringplan bei Saatgut in der Saison 2009/2010. Bundesamt für Ernährungssicherheit, Wien [Internet: <http://www.baes.gv.at/saat-pflanzgut/gvo/monitoringberichte/>; verifiziert 28 Jan 2012].

Trockentoleranz in Gerste - Ansätze zur Phänotypisierung Drought tolerance in barley - approaches for phenotyping

Henrik Schumann^{1*}, Anne Reinders¹, Alexandra Bothe¹, Melanie Herker¹, Stefan Paulus² und Jens Léon¹

Abstract

Objective of this study was to improve the selection efficiency for drought tolerant barley. In pot experiments, within foliar tunnels, genotypes were grown in micro crop stands of 12 plants. In three drought scenarios (no, 3 weeks before, 3 weeks after flowering) morphological, stress- and yield-physiological and yield parameters were evaluated. Questions were: Are the parameters able to detect drought stress during the vegetation period? Do they have a relation to yield reduction? Can they be determined with the non-invasive techniques Hyperspectral Imaging and Laser Scanning? As a result of first experiments we got significant relations between special plant stress parameters and the number of grains per ear (multiple regression $R^2=0.98$) and the grain yield ($R^2=0.96$). In the ongoing experiments the number of tested genotypes will be increased up to 24, 36 and 144 (for association mapping) for detecting genotype-specific reaction patterns to terminated drought. First significant correlation coefficients up to $r=-0.95$ between reflectance values at specific wavelengths within VISNIR-spectrum (380-900 nm) and plant parameters like SPAD, dry and water mass of the barley plants foretell the potential of the non-invasive Hyperspectral Imaging technique. The ability to get 10 morphological - traditional and also new - plant parameters with one scan from a highly precise 3D-laser scanning system and to detect drought stress already at the 4th day after withholding irrigation water foretells the potential also of this non-invasive 3D-laser scanning technique.

Keywords

Drought tolerance, *Hordeum vulgare*, hyperspectral imaging, phenotyping, 3D-laser scanning, yield

Zusammenfassung

Im Rahmen des prognostizierten Klimawandels werden neben längeren und trockeneren Sommern auch schnellere und intensivere Wechsel von kurzzeitigen Trocken- und sich anschließenden Vernässungsperioden vorausgesagt. Im Rahmen der Forschungsarbeiten zur züchterischen Verbesserung der Trockentoleranz von Sommergerste werden an der Professur für Pflanzenzüchtung der Universität Bonn diese Bedingungen in Gefäßversuchen in Folientunneln kontrolliert und beschreibbar nachvollzogen. Durch eine

dreiwöchige Verminderung der Bewässerungsgabe werden die Feuchtegehalte im Boden von der Feldkapazität bis zum permanenten Welkepunkt abgesenkt und anschliessend durch intensive Benässung wieder auf Kontrollniveau angehoben. Die zu untersuchenden Genotypen werden in Kleinstbeständen von 12 Pflanzen angebaut. Während der Vegetation werden diese intensiv auf morphologische, stress- und ertragsphysiologische Pflanzenparameter hin untersucht, um festzustellen, ob und welche dieser Parameter Trockenstress anzeigen. Am Ende der Vegetationsperiode werden mit Hilfe einer detaillierten Kornertragsanalyse die Auswirkungen der dreiwöchigen Trockenphasen vor und nach der Blüte auf die Ertragsbildung ermittelt. Die Quantifizierung der Beziehung zwischen den Trockenstress anzeigenden Pflanzenparametern und den Ertragswirkungen soll die Bedeutung einzelner Parameter für die Trockentoleranz von Gerste aufzeigen.

In ersten Experimenten konnte nach dreiwöchiger Trockenheit Trockenstress detektiert und in multiplen Regressionen signifikante Beziehungen von Sprossrockenmasse, SPAD-Wert, grüner Blattfläche, Blattprolinegehalt, Wurzellänge, Sprosswassergehalt und Blattemperatur zur Kornzahl pro Ähre ($R^2=0,98$) und von Sprossrockenmasse, Wurzellänge und Sprosswassergehalt zum Kornertrag ($R^2=0,96$) hergestellt werden. Die unzureichende genetische Variation des Gerstenmaterials erlaubte jedoch keine verallgemeinernden Aussagen bzw. Detektion genotypen-spezifischer Reaktionsmuster auf die zeitlich begrenzte Trockenheit.

Im Rahmen der angelaufenen Forschungsprojekte in den Verbänden „Phenomics, Transcriptomics und Genomics - ein integrativer Ansatz zur Effizienzsteigerung in der Selektion trockenstresstoleranter Gerste“ sowie „CROP.SENSE.net“ (<http://www.cropsense.uni-bonn.de>; Subproject GA2) werden jetzt variationsreichere Sommergerstensets mit 24 bis zu 144 Genotypen untersucht.

Ziel des Teilprojektes „Phenomics“ im ersten Forschungsverbund ist die Evaluierung von Pflanzenparametern für die merkmals- und markergestützte Selektion. In Gefäßversuchen werden die Pflanzenparameter unter kontrollierten Bedingungen hinsichtlich Trockenstressdetektionsfähigkeit und Ertragsrelevanz geprüft und an fünf Feldstandorten in Deutschland unter den natürlichen Bedingungen des Zuchtgartens verifiziert.

Ziel des Teilprojektes GA2 „Zerstörungsfreie Wachstumsanalyse“ im Forschungsverbund „CROP.SENSE.net“ ist die Ableitung von ertragsphysiologischen Wachstumsparametern

¹ Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES), Pflanzenzüchtung, Universität Bonn, Katzenburgweg 5, D-53115 BONN

² Institut für Geodäsie und Geoinformation (IGG), Geodäsie, Universität Bonn, Nussallee 17, D-53115 BONN

* Ansprechpartner: Henrik SCHUMANN, h.schumann@uni-bonn.de

tern aus den zerstörungsfrei arbeitenden Messverfahren des Hyperspectral Imaging und des Laser Scanning, um während der gesamten Vegetationsperiode fortlaufend eine große Anzahl von Genotypen hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens z.B. bezüglich Trockenstress differenzieren zu können.

Aus ersten Korrelationsrechnungen ergaben sich hohe signifikante Korrelationskoeffizienten zwischen Reflektanzen in bestimmten Wellenlängenbereichen des VISNIR-Spektrums (380-900 nm) und den Parametern SPAD-Wert ($r=-0.95$ bei 552-572 nm), Trockenmasse ($r=-0.85$ bei 568-585 nm) und der Wassermasse der Gerstenpflanzen ($r=-0.88$ bei 564-651 nm). Hiermit deutet sich das Potential des Hyperspectral Imaging als nicht-invasivem Messverfahren an.

Mit Hilfe eines hochpräzisen 3D-Lasermesssystems gelang es, aus 3D-Punktwolken von bis zu 420.000 Punkten mit einem Scan 10 morphologische Pflanzenparameter zu extrahieren. Traditionelle ertragsphysiologische Pflanzenparameter wie die Blattfläche und die Pflanzenhöhe konnten jetzt mit bedeutend höherer Genauigkeit und zerstörungsfrei ermittelt werden. Außerdem konnten neue in der Nutzpflanzenforschung bisher nicht genutzte Parameter wie das Volumen der Pflanzen berechnet werden. Bereits ab dem 4. Tag nach Wasservorenthalt gelang es, mit Hilfe solcher morphologischen Parameter Trockenstress zu detektieren

und das Potential auch dieser nicht-invasiven Messmethode aufzuzeigen.

Danksagung

Die Arbeiten werden finanziert durch die deutschen Bundesministerien für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz sowie für Bildung und Forschung.

Literatur

- CATTIVELLI L, RIZZA F, BADECK FW, MAZZUCOTELLI E, MASTRANGELO AM, FRANZIA E, MARÈ C, TONDELLI A, STANCA AM, 2008: Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crop Res* 105: 1-14.
- IZANLOO A, CONDON AG, LANGRIDGE P, TESTER M, SCHNURBUSCH T, 2008: Different mechanisms of adaptation to cyclic water stress in two South Australian bread wheat cultivars. *J Exp Bot* 59: 3327-3346.
- MUNNS R, JAMES RA, SIRSAULT XRR, FURBANK RT, JONES HG, 2010: New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. *J Exp Bot* 61: 3499-3507.
- SCHUMANN H, REINDERS A, MOHAMED N, LÉON J, 2010: Detection of reaction types to drought stress in an international barley collection. In: Ceccarelli S, Grandi S (Eds.), *Proc 10th Int Barley Genet Symp*, 5-10 Apr 2008, Alexandria, Egypt, pp. 260-264. ICARDA, Aleppo, Syria.

Phänotypisierung mittels Nahinfrarot-Spektroskopie am Beispiel Gelbpigmentgehalt des Weizens

Application of FT-NIRS for prediction and screening of wheat species in regard to carotenoid concentration

Susanne Kirchmaier¹, Johann Vollmann¹, Negash Geleta Ayana¹,
Susanne Siebenhandl-Ehn², Michael Prückler² und Heinrich Grausgruber^{1*}

Abstract

Colour is an important criterion for wheat flour quality. A strong pigmentation by carotenoids is desirable in durum wheat since a bright yellow colour is a quality factor of pasta. Contrary, flour of bread wheat should be as white as possible, hence, a minimum pigmentation is sought after for baking products. The determination of yellow endosperm pigmentation by standard methods requires both chemicals, respective lab equipment and time. In the present study Fourier transform near infrared spectroscopy was used to develop a prediction model for yellow endosperm pigmentation across various wheat species to allow a faster, cheaper and chemical free selection of genotypes. The obtained prediction model is robust enough for selection, however, misses analytical accuracy ($R^2=0.82-0.88$). Moreover, samples spiked with various concentrations and types of carotenoids were used to identify infrared wavelength regions which reacted significantly to the respective carotenoids. Principal component analysis was applied to the spectra for qualitative analysis and revealed a significant clustering of genotypes according to wheat species. The grouping of genotypes/species was mainly influenced by kernel hardness and particle size and not by the yellow pigmentation.

Keywords

Carotenoid, near infrared reflectance spectroscopy, *Triticum*, yellow pigment, wheat quality

Einleitung

Weizen (*Triticum* L.) zählt neben Mais, Reis und Gerste zu den wichtigsten Kulturarten weltweit (KILIAN et al. 2009) und stellt die wichtigste Frucht zur Erzeugung von Nahrungsmitteln dar, da er sowohl für den menschlichen als auch tierischen Verzehr direkt verwendet werden kann. Er wird erfolgreich in beinahe allen Regionen der Erde, von 67° nördlicher (Norwegen, Finnland, Russland) bis 45° südlicher (Argentinien, Chile) Breite, kultiviert (GUSTAFSON et al. 2009). Eine große Bedeutung besitzt Weizen in der Religion und im täglichen Leben. Einen zentralen Ritus

nimmt Weizen in der Form des Brotes in der jüdischen und christlichen Religion ein (PRANCE und NESBITT 2005). Die große Bedeutung von Weizen führte im Laufe der Zeit zu einer intensiven Züchtungstätigkeit. Ein steter Zuwachs der Anbaufläche und des Ertrages waren die Folge.

Die Pigmentierung des Endosperms ist ein wichtiges Kriterium für die Qualität von Weizenmehl. Eine starke Färbung durch Carotinoide ist bei Hartweizen (*T. durum*) erwünscht, um eine möglichst gute natürliche Gelbfärbung von Pasta und Teigwaren zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu sollte das Mehl von Brotweizen (*T. aestivum*) so weiß wie möglich sein (LEPAGE und SIMS 1968). Für spezifische Produkte ist ein hoher Gelbpigmentgehalt auch beim hexaploiden Weizen erwünscht: Asiatische Nudeln (*Cantonese noodles*) werden aus Weizenmehl, Wasser und Kansui (eine Mischung aus Natrium- und Kaliumcarbonat und -phosphat) hergestellt und sollen eine glänzende, bleiche, gelbe Farbe aufweisen (KRUGER et al. 1992). In Weizenarten kommt als Gelbpigment hauptsächlich das Xanthophyll Lutein vor (LEPAGE und SIMS 1968, HENTSCHEL et al. 2002, HIDALGO et al. 2006, ABDEL-AAL et al. 2007). Obwohl die Existenz von sekundären Inhaltsstoffen in Pflanzen seit 100 Jahren bekannt ist, sind deren Wirkung wie protektive Effekte gegen Krankheiten erst kürzlich in das Blickfeld der Forscher und Ernährungswissenschaftler gerückt. Früher wurden diese Inhaltstoffe oft als antinutritiv und wertlos betrachtet, und das Ziel der Pflanzenzüchter war es, den Gehalt an solchen Stoffen zu reduzieren oder sie gänzlich zu eliminieren (GRAUSGRUBER et al. 2006).

Nahinfrarotreflexionsspektroskopie, NIRS oder NIR abgekürzt, ist ein physikalisches Analyseverfahren auf Basis der Spektroskopie im kurzwelligen Bereich des Infrarotlichts. Mit Hilfe von Infrarotstrahlung werden kovalente Molekülbindungen in (zumeist) organischen Verbindungen angeregt. Die Detektion der Strahlungsabsorption funktioneller Gruppen von organischen Molekülen findet im nahen Infrarot (760-2500 nm) statt. Die NIRS Technologie hatte seit der ersten Anwendung in den 1960er Jahren in der Getreideindustrie einen enormen Aufschwung erfahren. Es entwickelte sich ein breites Feld der Anwendung: mittlerweile wird NIRS in verschiedensten Gebieten wie Materialwissenschaften, Nahrungsmittel, Umwelt, Medizin,

¹ Universität für Bodenkultur Wien, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Pflanzenzüchtung, Konrad Lorenz Straße 33, A-3430 TULLN

² Universität für Bodenkultur Wien, Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, Muthgasse 18, A-1190 WIEN

* Ansprechpartner: Heinrich GRAUSGRUBER, heinrich.grausgruber@boku.ac.at

Pharmazie, Landwirtschaft oder Archäologie eingesetzt (ESTEVE AGELET und HURBURGH 2010).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erstellung einer NIRS Kalibration für die Vorhersage des Gelbpigmentgehaltes in Weizenmehl, sowie die Prüfung, ob mittels multivariater Verrechnung der Spektraldaten die verschiedenen Weizenarten (*T. aestivum*, *T. durum*, *T. monococcum*, *T. carthlicum*, *T. karamyshevii*, *T. turanicum*) spektroskopisch voneinander unterscheidbar sind.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Das Probenstet bestand aus 478 Proben, bestehend aus mehr als 134 Genotypen von 6 verschiedenen Weizenarten: Einkorn (*T. monococcum*) (diploid), Persischer Weizen (*T. carthlicum*), Hartweizen (*T. durum*), Kolchischer Emmer (*T. karamyshevii*), Khorasanweizen (*T. turanicum*) (alle tetraploid) und Weichweizen (*T. aestivum*) (hexaploid). Die Proben stammten aus den Ernten 2003 bis 2009 von Versuchen der Universität für Bodenkultur bzw. der Saatzucht Donau im pannonischen Trockengebiet. Es waren Proben von sowohl konventionell als auch biologisch bewirtschafteten Flächen vorhanden.

Chemische Analyse

Der Gelbpigmentgehalt wurde mittels ICC Standard Methode 152 (International Association for Cereal Science and Technology, Wien) ermittelt. Dabei wurden je Probe 10 g Körner mit einer ZM 100 Ultra-Zentrifugal Mühle (Retsch GmbH & Co KG, Haan) ausgestattet mit einem 1,0 mm Sieb vermahlen. Fünf g Vollkornmehl wurden in einen Erlenmeyer Kolben gegeben und mit 25 ml wassergesättigtem *n*-Butanol (WSB) (1:6 v/v H₂O dest.:Butanol) versetzt und 2 min geschüttelt. Die Extraktion wurde unmittelbar nach der Vermahlung durchgeführt. Die Kolben wurden bei Raumtemperatur und Verdunkelung für 18 bis 20 Stunden abgestellt. Anschließend wurde die Suspension in lichtgeschützte (braune) Gefäße durch ein Whatman Faltenfilter (Grad 595^{1/2}; Ø 110 mm; Sigma-Aldrich, Wien) filtriert. Die Extrakte wurden bei 440 nm Wellenlänge in einem U-1500 Spektrophotometer (Hitachi Ltd., Tokyo) gegen die Standardlösung (WSB) gemessen. Pro Extrakt wurden 4 Messungen durchgeführt. Die Kalibration wurde für β -Carotin erstellt, folglich wurden die Extinktionswerte in β -Carotin Äquivalente (mg ml⁻¹) umgewandelt unter Verwendung der Gleichung: $y = 182,84 \times \text{Extinktion} + 0,001$.

NIRS Analyse

Für die NIRS Messungen wurden etwa 5 g Körner mit einer Cyclotec 1093 Mühle (Foss, Höganäs) zu Vollkornmehl (1 mm Sieb) vermahlen. Die Erfassung der NIRS Spektren erfolgte mit einem FT-NIRS Spektrometer Matrix-I (Bruker Optik GmbH, Ettlingen) welches mit einer weißen Lichtquelle und einem InGaAs-Detektor ausgestattet ist. Die Reflexion wurde in einer Operationsbreite von 800 bis 2780 nm (12492 bis 3598 Wellen-cm⁻¹) mit einer Auflösung von 4 Wellen-cm⁻¹ aufgezeichnet. Jede Probe wurde 2 mal gemessen indem man die Küvette um 180° drehte.

Gespikte Proben

Zusätzlich zu den natürlichen Proben wurden auch mit Carotinoiden angereicherte Mehlproben der NIRS Analyse unterzogen. Dafür wurde Mehl eines Hartweizens (Durobonus) und eines Weichweizens (Saturnus) mit unterschiedlichen Konzentrationen an β -Carotin, Lutein und Zeaxanthin gespikt (Tabelle 1). Mittels UV-VIS Spektroskopie wurde der Gelbpigmentgehalt dieser Proben kontrolliert.

Tabelle 1: Carotinoid-Steigerungsstufen und Gelbpigmentgehalt der angereicherten Mehle von Saturnus und Durobonus

Table 1: Concentration of carotenoids and yellow pigment content (GP) of spiked flour samples of Saturnus and Durobonus

Carotenoid	Konzentration (ppm)	Saturnus		Durobonus	
		Code	GP ¹	Code	GP
Kontrolle	0	S1	3,811	D1	9,813
β -Carotin	5	S2	8,942	D2	14,734
Lutein		S3	8,693	D3	14,667
Zeaxanthin		S4	10,728	D4	16,206
β -Carotin	20	S5	22,522	D5	29,934
Lutein		S6	23,475	D6	29,959
Zeaxanthin		S7	29,369	D7	32,674
β -Carotin	40	S8	40,606	D8	43,286
Lutein		S9	43,968	D9	47,848
Zeaxanthin				D10	55,256

¹ GP: Gelbpigmentgehalt (ppm β -Carotin Äquivalente 100g⁻¹ TS)

Datenanalyse

Die Kalibration wurde mittels PLS (*Partial Least Square*) Regression in der Software Opus Quant 2 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen) erstellt. Die Spektren wurden dabei einer Streulichtkorrektur MSC (*Multiplicative Scatter Correction*) unterzogen um Verzerrungen zu reduzieren und die Signale der chemischen Information zu erhöhen (ESTEVE AGELET und HURBURGH 2010). Deutliche Ausreisser wurden aus den Berechnungen entfernt. Die erhaltenen Kalibrationen wurden an Hand des Bestimmtheitsmaßes R^2 und dem Standardfehler der Kreuzvalidierung verglichen und bewertet. Die Klassifizierung der Weizenmuster wurde durch eine chemometrischen Mustererkennung durchgeführt. Dabei wurden die Spektraldaten einer Hauptkomponentenanalyse (PCA, *Principal Component Analysis*) mittels Unscrambler Software (Camo AS, Trondheim) unterzogen.

Ergebnisse und Diskussion

Gelbpigmentgehalt

Der durchschnittliche Gelbpigmentgehalt (GP) über alle Weizenarten betrug 5,84 ppm β -Carotin Äquivalente i. TS). Die geringste Konzentration (1,65 ppm) wurde in Weichweizen, die höchste (15,93 ppm) in Einkorn nachgewiesen (Tabelle 2). Eine große Variationsbreite, eine gleichmäßige Verteilung der Proben über die Variationsbreite und eine hohe Anzahl an Proben sind Voraussetzungen für eine robuste Kalibration (ESTEVE AGELET und HURBURGH 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Voraussetzungen erfüllt.

Die deutlich höchsten Konzentrationen an Gelbpigment wurden für Einkorn festgestellt. Dies deckt sich mit einer

Tabelle 2: Variation im Gelbpigmentgehalt (ppm) verschiedener Weizenarten
Table 2: Variation in yellow pigment concentration (ppm) of diverse wheat species

	<i>monococcum</i>	<i>durum</i>	<i>carthlicum</i>	<i>karamyshevii</i>	<i>turanicum</i>	<i>aestivum</i>
Mittelwert	11,19	8,89	2,96	2,67	4,99	4,34
Minimum	3,93	3,34	2,84	2,67	2,66	1,65
Maximum	15,93	15,37	3,10	2,67	7,14	7,48
Proben (n)	166	213	3	1	64	31

auch Sorten bekannt, die Gehalte im Bereich von Durum aufweisen und die v.a. im asiatischen Raum für die Herstellung von Teigwaren verwendet werden (KRUGER et al. 1992, GRAUSGRUBER et al. 2006). Auch in Europa wurden solche Sorten gezüchtet (SVENSSON 1982, SCHIPPER et al. 1998), erlangten jedoch bis heute keine große Bedeutung in der Verarbeitung.

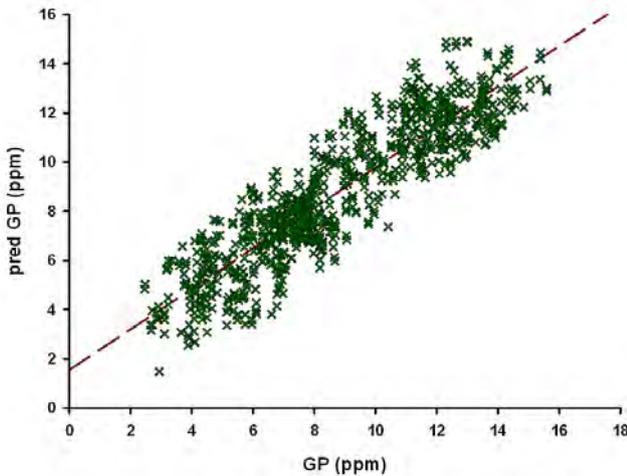


Abbildung 1: FT-NIRS Kalibration für Gelbpigmentgehalt (GP) in Weizen

Figure 1: FT-NIRS calibration for yellow pigment concentration (GP) of wheat species

Reihe von anderen Untersuchungen (ABDEL-AAL et al. 2002, LØJE H et al. 2003, HIDALGO et al. 2006). Der für Einkorn niedrigste Gehalt von 3,93 ppm wurde für eine blaukörnige (*blue aleurone*) Herkunft festgestellt. Durum zeigte einen durchschnittlichen Gehalt von 8,89 ppm und lag damit über den Gehalten der anderen tetraploiden Weizenarten, die somit keine offensichtlichen genetischen Ressourcen zur Erhöhung des Gelbpigmentgehaltes darstellen. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass die Probenanzahl bei Persischem Weizen und Kolchischem Emmer sehr gering war. Weichweizen besitzt i.d.R. sehr niedrige Konzentrationen an Gelbpigment, allerdings sind

Quantitative Analyse

In *Abbildung 1* ist die ausgewählte Kalibration abgebildet, wobei auf der Abszisse die tatsächlich gemessenen Werte (WSB Referenzmethode) und auf der Ordinate die durch NIRS vorhergesagten Werte dargestellt sind. Die beste Kalibration ($R^2=0.88$; *root mean square error of estimation* RMSEE=1,08) berücksichtigte Spektren des Wellenlängenbereichs $\lambda=801-2355$ nm bei einem Rank von 9 (PLS Regressionsvariablen). In diese Kalibration flossen 434 Proben ein, d.h. 44 Proben wurden als Ausreisser deklariert und aus der Kalibration entfernt. Die Kreuzvalidierung ergab ein $R^2=0.82$ und einen *root mean square error of cross validation* RMSECV=1,34. Die bestehende Kalibration erscheint somit für Selektionszwecke sehr gut geeignet, für eine analytische Bestimmung jedoch noch zu ungenau.

Qualitative Analyse

Carotinoide haben ihre Lichtabsorptionsmaxima im sichtbaren Wellenlängenbereich (BRITTON 1996). An Hand der Regressionskoeffizienten der Kalibration ist jedoch ersichtlich, dass auch im Bereich von $\lambda=1700-2350$ nm ($\nu=5900-4250$ cm^{-1}) mehrere hoch positive bzw. negative Koeffizienten auftreten (*Abbildung 2*). Dieser Wellenlängenbereich stimmt auch gut überein mit den Ergebnissen von BRENNAN und BERARDO (2004), die bei Mais einen NIR Bereich von 1150 bis 2400 nm als optimal zur Messung von Lutein und Zeaxanthin feststellten. Für die qualitative Analyse mittels PCA wurde somit dieser deutlich auf den Gelbpigmentgehalt reagierende Wellenlängenbereich ausgewählt. In *Abbildung 3* ist der Biplot (PC1 vs PC2) der PCA dargestellt. Es ist eine deutliche Gruppierung zwischen diploidem Einkorn (*T. monococcum*) und tetraploidem Hartweizen (*T. durum*,

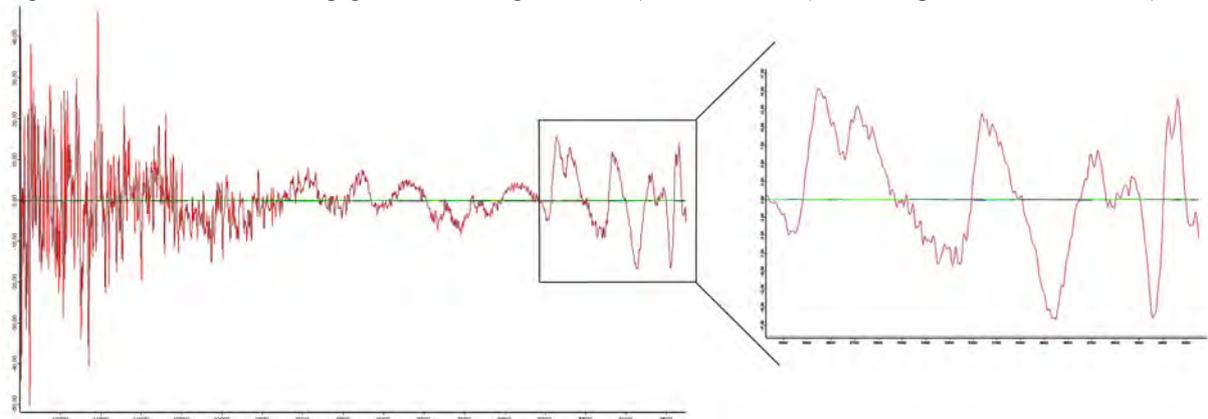


Abbildung 2: Regressionskoeffizienten der FT-NIRS Kalibration auf Gelbpigmentgehalt (Angabe der Wellenlänge als Wellenzahl·cm⁻¹)

Figure 2: Regression coefficients for the FT-NIRS prediction model for yellow pigment concentration of wheat flour (wavelength is indicated as wave number·cm⁻¹)

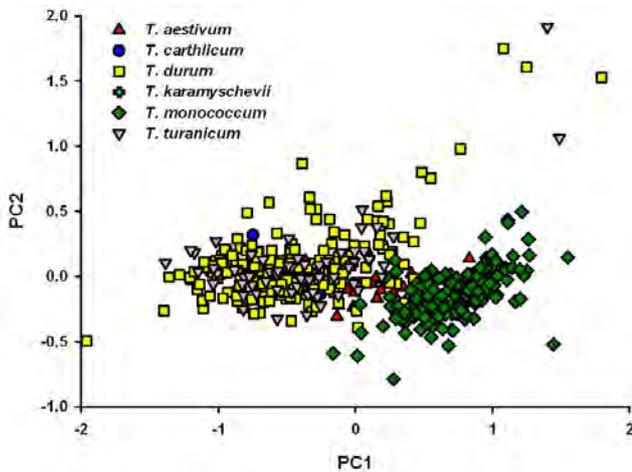


Abbildung 3: Biplot der Hauptkomponentenanalyse der FT-NIRS Spektren ($\nu=3600-6500 \text{ cm}^{-1}$)

Figure 3: Biplot of PCA of FT-NIRS spectra ($\nu=3600-6500 \text{ cm}^{-1}$)

T. turanicum, *T. carthlicum*, *T. karamyshevii*) zu erkennen. Der hexaploide Weichweizen (*T. aestivum*) liegt zwischen den beiden Gruppen. Die Gruppierung erfolgt hier somit nicht nach dem Gelbpigmentgehalt, sondern offensichtlich v.a. aufgrund der unterschiedlichen Kornhärte und Partikelgröße. Auch wenn alle Proben mit der gleichen Siebgröße vermahlen wurden, ist der Einfluss der Kornhärte und in Folge der Partikelgröße entscheidend. Dies wurde für den verwendeten Mühlen- und Siebtyp auch von WILLIAMS (1979) für Durum und Weichweizen mit harter (*hard red/white wheat*) bzw. weicher (*soft white wheat*) Korntextur

nachgewiesen. Einkorn besitzt im Vergleich zu Weichweizen eine noch einmal deutlich niedrigere Kornhärte (BRANDOLINI et al. 2008).

Gespikte Proben

Bei der Analyse der NIR Spektren der gespikten Proben konnten deutliche Effekte der Carotinoid-Anreicherung im bereits zuvor erwähnten Wellenlängenbereich festgestellt werden. Bei Anreicherung mit 40 ppm Lutein, Zeaxanthin und β -Carotin sind deutlich höhere Reflexionsintensitäten ersichtlich (Abbildung 4). Die Anreicherungen mit 5 und 20 ppm heben sich zwar auch gegenüber der Kontrolle ab, sind jedoch untereinander teilweise überlappend. Die Effekte waren für alle drei Carotinoide und beide Sorten, Durobonus (*T. durum*) und Saturnus (*T. aestivum*), gegeben. Gespikte Proben können prinzipiell auch für die Erstellung der Kalibration herangezogen werden um die Variationsbreite im Referenzprobenset zu erhöhen (WILSON et al. 2002, LOCHER et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese erstellt, dass Proben mit einem hohen Gehalt an Gelbpigmenten bei der qualitativen Analyse mittels PCA in der grafischen Darstellung (Biplot) in der Umgebung der entsprechend hoch mit Carotinoiden gespikten Proben liegen müssten. Damit wäre ein Auffinden von züchterisch interessanten Ressourcen aus einer großen Anzahl von Genotypen ohne vorher notwendige nass-chemische Analysen möglich. Leider konnte diese Hypothese nicht eindeutig bestätigt werden, auch dann nicht, wenn nur eine Weizenart (Durum) berücksichtigt wurde. Verantwortlich dafür sind höchstwahrscheinlich die unterschiedlichen

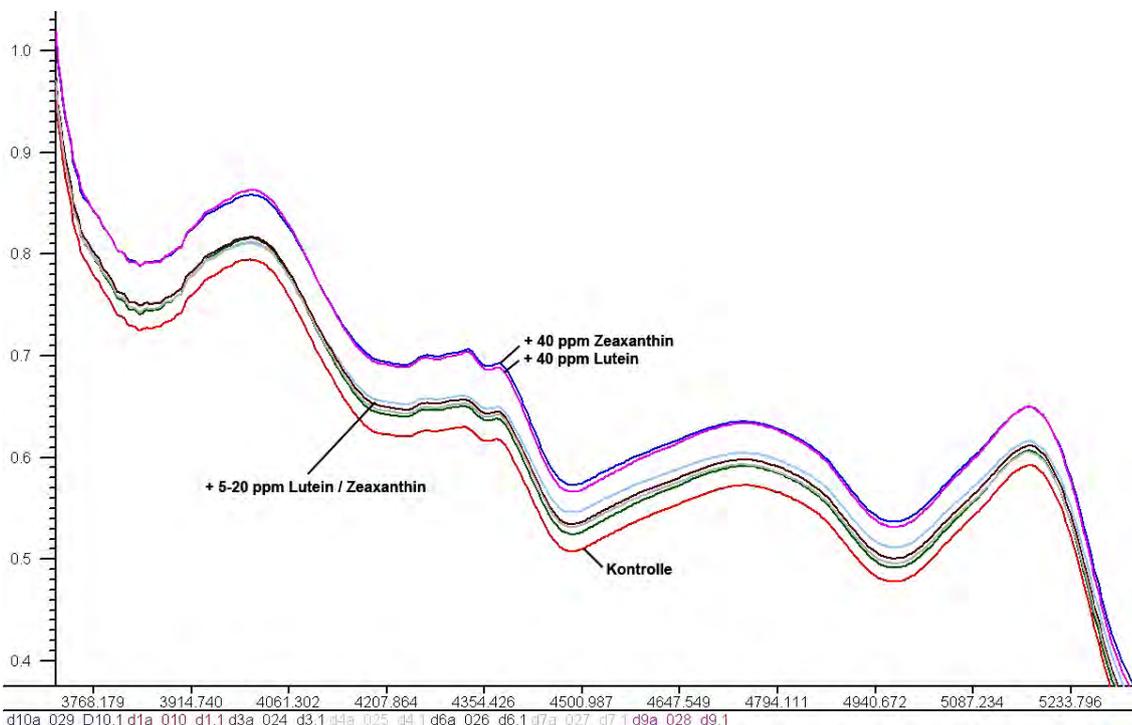


Abbildung 4: FT-NIRS Spektren von Vollkornmehl von Durobonus angereichert mit unterschiedlichen Carotinoiden und Konzentrationen (siehe Tabelle 1; Anreicherungen mit β -Carotin nicht dargestellt)

Figure 4: FT-NIRS spectra of whole grain flour of durum wheat Durobonus spiked with different carotenoids and concentrations (see Table 1; β -carotene spiked samples are not shown)

Umwelten (Jahre, Standorte, Produktionssysteme) aus denen die Proben stammen. Dadurch kann es im Biplot zu einer Verschiebung der Proben kommen (MØLLER 2004, JACOBSEN et al. 2005).

Danksagung

Julia Lafferty (Saatzucht Donau, Probstdorf) sei herzlich für die Bereitstellung von Proben und Ergebnissen gedankt. Für die technische Assistenz bei den chemischen Analysen gilt der Dank Viola Zahlner, Ingrid Weinzel und Loredana Leopold.

Literatur

- ABDEL-AAL ESM, YOUNG JC, WOOD PJ, RABALSKI I, HUCL P, FRÉGEAU-REID J, 2002: Einkorn: A potential candidate for developing high lutein wheat. *Cereal Chem* 79: 455-457.
- ABDEL-AAL ESM, YOUNG JC, RABALSKI I, HUCL P, FREGEAU-REID J, 2007: Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *J Agric Food Chem* 55: 787-794.
- ESTEVE AGELET L, HURBURGH CR, 2010: A tutorial on near infrared spectroscopy and its calibration. *Crit Rev Anal Chem* 40: 246-260.
- BRANDOLINI A, HIDALGO A, MOSCARITOLO S, 2008: Chemical composition and pasting properties of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) whole meal flour. *J Cereal Sci* 47: 599-609.
- BRENNAN OV, BERARDO N, 2004: Application of near-infrared reflectance spectroscopy (NRS) to the evaluation of carotenoids content in maize. *J Agric Food Chem* 52: 5577-5582.
- BRITTON G, 1996: Carotenoids. In: Hendry GAF, Houghton JD (Eds.), *Natural food colorants*, pp. 197-243. Chapman & Hall, London.
- GRAUSGRUBER H, SIEBENHANDL S, ETICHA F, BERGHOFER E, 2006: Carotenoids and anthocyanins in wheat (*Triticum* sp.). *Vortr Pflanzenzüchtg* 69: 117-125.
- GUSTAFSON P, RASHIMA O, MA XF, NEVO E, 2009: Wheat evolution, domestication, and improvement. In: Carver B (Ed.), *Wheat science and trade*, pp. 5-30. Wiley-Blackwell, Ames, IA.
- HENTSCHEL V, KRANL K, HOLLMANN J, LINDHAUER MG, BÖHM V, BITSCH R, 2002: Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *J Agric Food Chem* 50: 6663-6668.
- HIDALGO A, BRANDOLINI A, POMPEI C, PISCOZZI R, 2006: Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.). *J Cereal Sci* 44: 182-193.
- JACOBSEN S, SØNDERGAARD I, MØLLER B, DESLER T, MUNCK L, 2005: A chemometric evaluation of the underlying physical and chemical patterns that support near infrared spectroscopy of barley seeds as a tool for explorative classification of endosperm genes and gene combinations. *J Cereal Sci* 42: 281-299.
- KILIAN B, ÖZKAN H, POZZI C, SALAMINI F, 2009: Domestication of the Triticeae in the Fertile Crescent. In: Feuillet C, Muehlbauer GJ (Eds.), *Genetics and genomics of Triticeae*, pp. 81-119. *Plant genetics and genomics: Crops and models*, Vol. 7. Springer Science+Business Media.
- KRUGER JE, MORGAN B, MATSUO RR, PRESTON KR, 1992: A comparison of methods for the prediction of Cantonese noodle color. *Can J Plant Sci* 72: 1021-1029.
- LEPAGE M, SIMS RPA, 1968: Carotenoids of wheat flour: their identification and composition. *Cereal Chem* 45: 600-604.
- LOCHER F, HEUWINKEL H, GUTSER R, SCHMIDHALTER U, 2005: Development of near infrared reflectance spectroscopy calibrations to estimate legume content of multispecies legume-grass mixtures. *Agron J* 97: 11-17.
- LØJE H, MØLLER B, LAUSTSEN AM, HANSEN A, 2003: Chemical composition, functional properties and sensory profiling of einkorn (*Triticum monococcum* L.). *J Cereal Sci* 37: 231-240.
- MØLLER B, 2004: Near infrared transmission spectra of barley of malting grade represent a physical-chemical fingerprint of the sample that is able to predict germinative vigour in a multivariate data evaluation model. *J Inst Brew* 110: 18-33.
- PRANCE G, NESBITT M, 2005: *The cultural history of plants*. Routledge, New York.
- SCHIPPERA, JAHN-DEESBACH W, HANNEFORTH U, ZWINGELBERG H, 1998: Weizen für besondere Verwendungszwecke: Gelbpigment-Weizen. *Mühle + Mischfüttertechnik* 135: 14-16.
- SVENSSON G, 1982: Aestivumweizen mit gelbem Farbton für die Teigwarenherstellung. *Getreide Mehl Brot* 36: 315-316.
- WILLIAMS PC, 1979: Screening wheat for protein and hardness by near infrared reflectance spectroscopy. *Cereal Chem* 56: 169-172.
- WILSON ND, IVANOVA MS, WATT RA, MOFFAT AC, 2002: The quantification of citral in lemongrass and lemon oils by near-infrared spectroscopy. *J Pharm Pharmacol* 54: 1257-1263.

Anmerkung: Die Online-Version des Tagungsbandes enthält alle Abbildungen in Farbe und kann über die Homepage der Jahrestagung (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/> - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchertagung - Saatzüchertagung 2011) oder den korrespondierenden Autor bezogen werden.

Greenhouse test for drought tolerance of the CORNET wheat variety set

János Pauk^{1*}, Csaba Lantos¹, Róbert Mihály¹, Clemens Flamm², Maren Livaja³,
László Cseuz¹, Michael Schmolke³ and Szabolcs Ruthner⁴

Abstract

In a greenhouse experiment the alteration of seven agronomic characters (heading time, plant height, straw dry matter yield, spike length, number of spikelets, seed number per main spike, grain yield) was evaluated under well watered and water withdrawal conditions. The two different water regimes had a significant effect on the seven characters. Heading time, plant height, seed number per main spike and grain yield were more sensitive to water withdrawal than the other three traits. For all parameters different genotypes ranked tolerant and/or sensitive to drought stress. For breeders and growers grain yield is the outstanding character. Lowest yield losses were observed for GK Kalász, GK Fény, GK Hunyad, Premio and Komárom. The most sensitive varieties were Robigus, Exklusiv, GK Szala and Capo when the well watered treatment was compared to the water withdrawal treatment.

Keywords

Abiotic stress, drought tolerance, *Triticum aestivum*, water withdrawal, yield

Introduction

Drought is the most significant environmental stress factor restricting plant production in major parts of worldwide agricultural production. Environmental stresses, such as drought, heat shock, high salinity and low temperature, have adverse effects on plant growth and seed production. Plants respond and adapt to these stresses through various biochemical and physiological processes, thereby acquiring stress tolerance (BOYER 1982). Depending on the agriculture areas, significant yield losses can be detected in abiotic stress-hit seasons (BRAY et al. 2000). Among abiotic stresses, drought is the most frequent abiotic stress in the area of East and Central Europe. In wheat (*Triticum aestivum* L.), yield loss can amount up to 80% of the yield potential realised under optimal environmental conditions (BRAY 1997, MAJER et al. 2008). Comparing the eight major crops (wheat, barley, corn, sorghum, soybean, oat, potato, sugar beet), wheat is the most sensitive to abiotic stresses involving drought (BRAY 1997). Improvement of yield stability under (drought) stress conditions requires

the optimization of several physiological functions such as regulation of water status of tissues (BRODRIBB and HOLBROOK 2003, MARTINEZ et al. 2003), photosynthesis (LAWLOR 2002, MEDRANO et al. 2002), and translocation of assimilates (BRAY et al. 2000, LAWLOR 2002, PASSIOURA 2002).

Some plants are able to cope with arid environments by mechanisms that mitigate drought stress, such as stomatal closure, partial senescence of tissues, reduction of leaf growth, development of water storage organs, and increased root length and density, in order to use water more efficiently. Water flux through the plant can be reduced or water uptake can be increased by several physiological adaptations. These mechanisms allow plants to survive in arid environments by lessening the severity of drought stress, but they do not make these plants tolerate desiccation. In fact, with long periods of drought these plants will dehydrate and die (SCOTT 2000).

Drought and high temperature occur together in many regions of the world but they usually are investigated separately. The extent of thermal as well as drought induced disruption of grain development, however, is dependent on the genotype (KAUR et al. 2011). The interaction of high temperature and drought stress results in a stronger reduction of pericarp thickness and endosperm size than each stress alone (KAUR et al. 2011).

In rain-fed agricultural regions, limited rainfall and frequent unpredictable droughts result in low and variable wheat yields. Balanced water use between root water-uptake and remaining soil moisture is a key factor for drought adaptation. A significant negative correlation was found between root water-uptake ability and grain weight, suggesting that lower root water-uptaking ability was associated with higher grain weight (MORI et al. 2011).

Drought tolerance is a complex trait. Agronomic, phenological and physiological traits, which are connected to yield and yield parameters, can be used more or less for the prediction of yield parameters (PINTO et al. 2010). However, breeding programmes deal with thousands of lines every year. Hence, tests used in selection should be fast, easy-to-apply and cheap, like the water retention ability test of excised flag leaves (CLARKE and McCAIG 1982a,b), chemical desiccation method, irrigation tests (McCAIG and ROMAGOSA 1989) and canopy thermometry. Recently, important novel tools

¹ Department of Biotechnology, Cereal Research Non-Profit Ltd., Alsó kikötő sor 9, H-6701 SZEGED

² Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

³ Technische Universität München, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, Emil Ramann Straße 4, D-85354 FREISING

⁴ Hungarian Seed Association, Ábel Jenő street 4/b, H-1113 BUDAPEST

* Ansprechpartner: János PAUK, janos.pauk@gk-szeged.hu

are used in drought breeding programs, like rain shelters in field experiments and complex stress diagnostic system in greenhouse experiments (MAJER et al. 2008).

In the present study the drought tolerance of 25 commercial European (6 German, 9 Austrian, 8 Hungarian, 1 English, 1 French) wheat varieties was tested under well watered and water withdrawal conditions in a greenhouse experiment. Alteration of seven agronomic traits (i.e. heading date, plant height, dry matter yield of straw, spike length, number of spikelets per main spike, grain number per main spike, grain yield of main spike) were analysed. Results from the well watered treatment were compared to the water withdrawal treatment.

Material and methods

Plant material

Altogether 25 European winter wheat varieties were tested for their adaptability to drought stress within the COLlective REsearch NETworking (CORNET) project “Wheat Stress”. In detail, 4 varieties originated from Germany (2 of them were hybrid wheat varieties), 9 from Austria, 8 from Hungary and 1 from both France and Great Britain (Table 1).

Experimental condition

The drought tolerance experiment was carried out as pot experiment in the greenhouse. The seeds were sown into normal soil in 50×20 mm plastic pots. Two seeds were sown per pot. After germination the plantlets were vernalized for 6 weeks at 3-4°C in permanent dim light. After vernalization, the plantlets (2-3 leaves) were transplanted (4 plantlets per water regime) into black plastic pots filled with a special soil and fertilizer (1340 g sand, 526 g peat, 4 g Osmocote®). Before starting the experiment the water capacity of the soil was determined. Two different water regimes, i.e. well watered and water withdrawal, were applied during the whole life cycle of the plants. In the well watered treatment 60% water capacity, in the water withdrawal treatment only 20% of the soil water capacity was kept for the whole run of the experiment, i.e. 4875 ml (1625 ml per plant) and 1550 ml (517 ml per plant) water were used for irrigation, respectively. Watering was done twice a week keeping permanent water conditions in the pots.

Trait evaluation

Seven agronomic traits were determined in both water treatments: heading time, plant height, dry matter yield of straw, spike length per main spike, number of spikelets per main spike, number of grains and grain dry matter yield per main spike. Dry matter was determined as follows: at harvest the above-ground biomass was harvested by scissors and dried at 48°C to permanent weight.

Statistical analysis

At least three replications were recorded for each entry and treatment. The collected data were analysed by ANOVA using MS Excel 2002 software (Microsoft Co., Redmond, WA).

Results and discussion

Heading time

One of the most significant effect of water withdrawal was the alteration of heading time. A group of 7 varieties, i.e. Eurojet, Tiger, Komárom, Hyland, Element, JB Assano and GK Kalász, headed some days) earlier in the severe drought stress treatment compared to the well watered treatment (Figure 1). These group was named the *rescue group* meaning that the physiology of these genotypes was accelerated by water withdrawal (Figure 1). Another group of varieties, i.e. GK Fény, GK Csongrád, GK Hunyad and GK Békés, form the *stable group*, showing no change in heading time between the well watered and water withdrawal treatment. The third and largest group included 14 varieties, i.e. GK Szala, Premio, Bitop, GK Petur, GK Rába, Tacitus, Brilliant, Hybred, Pegassos, Robigus, Midas, Capo, Eurofit and Exklusiv, which showed a later heading time under water withdrawal. This group was named the *lazy group*. These genotypes respond to water withdrawal by 1 to 20 days later heading.

Under severe drought stress the heading time is a very sensitive, simultaneously well detectable parameter to control the response to stress treatment(s). Similar observations were made by MAJER et al. (2008) under permanent and by KAUR and BEHL (2010) under partial drought stress during the life cycle of wheat plants, respectively.

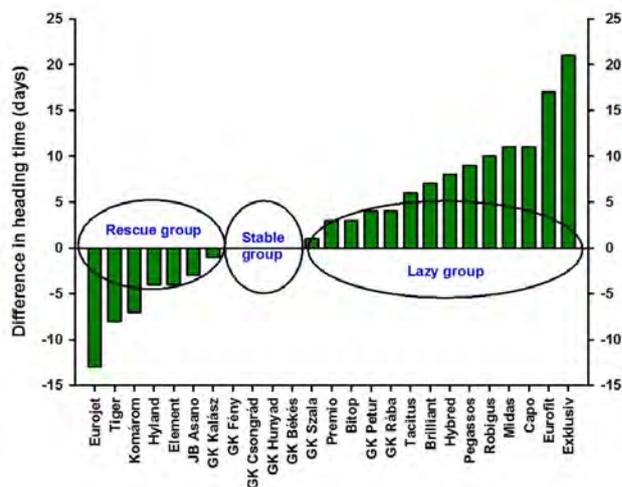


Figure 1: Effect of two different water treatments on heading time of winter wheat: differences of the drought stress treatment compared to the well watered (control) treatment

Plant height

Reduced plant height is a well-known symptom of drought stress. Under limited water supply, all plant species alter their green mass production (SCOTT 2000). In our experiment only a moderate effect of water withdrawal on plant height was observed for 3 varieties, i.e. GK Kalász, Premio and Komárom. These varieties tolerated water withdrawal the best of all varieties. For GK Kalász relative plant height realised under drought stress was significantly higher compared to the majority of varieties (Table 1). Most of the varieties

were significantly not different from Hybred and Tacitus, the varieties with the highest depression (>50%) of plant height. Therefore, it can be concluded that the effect of drought stress on plant height does not lead to a good differentiation between genotypes which was also observed in a previous study (CSEUZ et al. 2009). Contrary significant differences were observed for the number of seeds per main spike and for grain yield higher (see later results) demonstrating that small grain cereals were mainly improved in regard to seed production (increase in harvest index) and not for stalk (plant height) productivity (BRAY 1997).

Table 1: Plant height (cm) under two different water regimes and relative plant height (%) of the water withdrawal treatment compared to the control (well watered) treatment (Varieties with the same letters are not significantly different at $P=0.05$, $LSD_{5\%}=10.39$)

Variety	Origin	Control (Ctrl)	Water withdrawal (Wat-)	Relative plant height (Wat- \times 100/Ctrl)
GK Kalász	HU	54.5	42.0	77.06 ^a
Premio	FR	61.5	44.3	72.08 ^{ab}
Komárom	AT	56.0	39.3	70.23 ^{ab}
Tiger	DE	85.5	56.7	66.27 ^b
Capo	AT	66.5	41.7	62.65 ^{bc}
Bitop	AT	84.5	52.3	61.93 ^{bc}
Element	AT	72.5	44.7	61.60 ^{bc}
Brilliant	DE	71.0	43.3	61.03 ^{bc}
GK Szala	HU	63.5	38.0	59.84 ^{bc}
JB Asano	DE	79.0	47.0	59.49 ^{bc}
GK Hunyad	HU	88.5	52.5	59.32 ^{bc}
GK Petur	HU	59.5	35.0	58.82 ^{bc}
GK Fény	HU	79.0	46.3	58.65 ^{bc}
GK Békés	HU	77.0	44.7	58.00 ^{bc}
Eurojet	AT	79.5	45.3	57.02 ^{bc}
Eurofit	AT	84.0	46.3	55.15 ^c
Hyland	DE	81.0	44.7	55.14 ^c
GK Rába	HU	75.0	41.0	54.67 ^c
Midas	AT	85.5	46.7	54.57 ^c
GK Csongrád	HU	62.0	33.7	54.29 ^c
Pegassos	DE	93.0	50.0	53.76 ^c
Robigus	UK	55.0	29.5	53.56 ^c
Exklusiv	AT	70.0	37.0	52.86 ^c
Tacitus	AT	79.5	39.7	49.89 ^c
Hybred	DE	81.5	40.3	49.48 ^c

Dry matter yield of straw

During dry seasons the quantitative difference between varieties in regard to green biomass production is clearly visible and can be evaluated by visual scoring. In the present experiment dry matter production of different yield components were determined after harvest. The dry matter yield of straw (spikes were removed) showed an interesting trend. GK Hunyad reduced its straw production only for 34.6% in the water withdrawal treatment compared to the control treatment. GK Hunyad seems to be a biomass producing genotype (vegetative type) producing a significantly higher quantity of straw. The other 24 varieties did not show significant differences in comparison with each other. However, the mean values of Hybred, Tiger, Element, GK Békés, GK Szala, GK Kalász and Exklusiv were significantly not different from GK Hunyad (Table 2). In regard to straw dry matter yield the same tendency was obtained as for plant

height: the differences between the genotypes in both the well watered and the water withdrawal treatment were not outstanding to allow efficient selection. Similar results were obtained by other authors (BRAY 1997, CLARKE and McCAIG 1982a, MORI et al. 2011).

Table 2: Straw dry matter yield (g) under two different water regimes and relative straw yield (%) of the water withdrawal treatment compared to the control (well watered) treatment (Varieties with the same letters are not significantly different at $P=0.05$, $LSD_{5\%}=10.39$)

Variety	Control (Ctrl)	Water withdrawal (Wat-)	Relative straw yield (Wat- \times 100/Ctrl)
GK Hunyad	5.96	2.06	34.56 ^a
Hybred	4.84	1.35	27.89 ^{ab}
Tiger	5.71	1.59	27.85 ^{ab}
Element	5.33	1.48	27.77 ^{ab}
GK Békés	5.21	1.43	27.45 ^{ab}
GK Szala	5.15	1.39	26.99 ^{ab}
GK Kalász	4.77	1.27	26.62 ^{ab}
Exklusiv	4.83	1.28	26.50 ^{ab}
Bitop	5.72	1.49	26.15 ^b
Eurojet	5.43	1.42	26.12 ^b
Capo	5.51	1.39	25.23 ^b
Robigus	4.83	1.21	25.05 ^b
Komárom	5.92	1.45	24.49 ^b
Tacitus	5.86	1.43	24.40 ^b
Pegassos	6.14	1.48	24.10 ^b
Eurofit	6.26	1.49	23.80 ^b
Midas	6.58	1.55	23.56 ^b
Brilliant	5.89	1.38	23.43 ^b
GK Csongrád	5.21	1.21	23.22 ^b
Hyland	6.52	1.47	22.55 ^b
Premio	6.83	1.51	22.11 ^b
GK Petur	5.71	1.26	22.07 ^b
GK Fény	5.90	1.24	21.02 ^b
JB Asano	7.43	1.55	20.86 ^b
GK Rába	5.72	1.18	20.63 ^b

Spike length

In view of spike length the differences among the tested varieties were limited. The lowest reduction in spike length in the stress treatment was achieved by Element (82.71% relative spike length), while 23 varieties from Midas to Robigus did not show significant differences (Table 3). Exklusiv and Robigus showed the highest reduction. The effect of drought from the first day of transplantation of plantlets into pots until harvest caused significant spike length reduction, but this depression did not depend on the genetic character of spike length (long or short spikes). There were some varieties with long spikes, e.g. Pegassos and JB Asano, which reduced their spike length only moderately, whereas on the other hand there were some genotypes with short spikes, e.g. GK Petur and Robigus, which reduced their spike length significantly. In regard to grain yield no correlation between the decrease in spike length and grain yield was observed ($r_s=0.29$, $P=0.15$). From our results it can be concluded that spike length and its reduction by drought stress is not an important character playing to be looked at. Other characters like seed number per main spike etc. have more significant effects on grain yield.

Table 3: Spike length (mm) under two different water regimes and relative spike length (%) of the water withdrawal treatment compared to the control (well watered) treatment (Varieties with the same letters are not significantly different at $P=0.05$, $LSD_{5\%}=10.39$)

Variety	Control (Ctrl)	Water withdrawal (Wat-)	Relative spike length (Wat- \times 100/Ctrl)
Element	118.0	97.6	82.71 ^a
Midas	119.0	96.3	80.92 ^{ab}
GK Hunyad	112.0	88.0	78.57 ^{ab}
Tiger	123.5	95.0	76.92 ^{ab}
GK Petur	73.5	55.6	75.65 ^{ab}
GK Rába	106.5	79.3	74.46 ^{ab}
Brilliant	138.5	102.6	74.08 ^{ab}
Pegassos	139.5	103.0	73.84 ^{ab}
GK Békés	88.5	64.3	72.66 ^{ab}
GK Szala	99.0	69.3	70.00 ^{ab}
Bitop	115.0	79.6	69.22 ^{ab}
JB Asano	142.5	98.0	68.77 ^{ab}
GK Kalász	81.5	56.0	68.71 ^{ab}
GK Csongrád	81.0	55.3	68.27 ^{ab}
Premio	82.5	55.6	67.39 ^{ab}
GK Fény	81.5	54.3	66.63 ^{ab}
Eurojet	144.0	93.0	64.58 ^{ab}
Tacitus	120.5	75.6	62.74 ^{ab}
Hybred	128.0	79.3	61.95 ^{ab}
Hyland	126.5	75.6	59.76 ^{ab}
Komárom	129.0	77.0	59.69 ^{ab}
Capo	127.0	64.0	50.39 ^b
Eurofit	165.0	81.6	49.45 ^b
Robigus	93.5	28.3	30.27 ^{bc}
Exklusiv	105.0	15.0	14.29 ^c

Number of spikelets

The number of spikelets per spike was counted for each genotype in each treatment. The drought stress influenced significantly the number of spikelets. However, the differences were not so pronounced. GK Petur showed the smallest decrease in number of spikelets, while the means of the following 22 varieties were significantly not different. The highest decrease in spikelet number in the stress treatment was observed for Robigus and Exklusiv (Table 4). The results in spikelet number were associated with the results in regard to spike length. It can be concluded that Robigus and Exklusiv were the two varieties most sensitive to drought in regard to these two spike parameters. Regarding the relative number of spikelets the range of values is very demonstrative. According to these relative values some genotypes can be described as tolerant in keeping their number of spikelets under drought, e.g. GK Petur, GK Kalász and Tiger. On the other hand some genotypes, e.g. Hyland, Eurofit, Capo, Robigus and Exklusiv, lost more than half of their spikelets under drought stress which had a significant effect on grain production.

Seed number per main spike

The number of seeds per spike is one of the agronomic most important yield component. Significant differences were detected among tested varieties. The significantly lowest reduction was measured for GK Kalász (relative mean value 61.44 %) and GK Hunyad (49.11%), while 3 varieties, i.e. Exklusiv, GK Szala and Capo, showed extreme sensitivity to

Table 4: Number of spikelets per main spike under two different water regimes and relative spikelet number (%) of the water withdrawal treatment compared to the control (well watered) treatment (Varieties with the same letters are not significantly different at $P=0.05$, $LSD_{5\%}=10.39$)

Variety	Control (Ctrl)	Water withdrawal (Wat-)	Relative spikelet number (Wat- \times 100/Ctrl)
GK Petur	14.0	12.3	88.07 ^a
GK Kalász	16.0	12.3	77.06 ^{ab}
Tiger	23.0	17.3	75.35 ^{ab}
GK Hunyad	20.0	14.0	70.00 ^{ab}
Midas	23.0	16.0	69.57 ^{ab}
Pegassos	25.0	16.7	66.64 ^{ab}
Tacitus	24.0	15.7	65.25 ^{ab}
Brilliant	22.5	14.7	65.16 ^{ab}
Eurojet	24.5	15.7	63.92 ^{ab}
GKCsongrád	19.0	12.0	63.16 ^b
GK Békés	22.0	13.7	62.09 ^b
JB Asano	20.0	12.3	61.65 ^b
Komárom	19.5	11.7	59.80 ^b
Premio	15.5	9.0	58.06 ^b
Hybred	23.5	13.7	58.13 ^b
Bitop	19.5	11.0	56.41 ^b
GK Fény	21.5	12.0	55.81 ^b
GK Rába	23.5	13.0	55.32 ^b
Element	23.5	13.0	55.32 ^b
GK Szala	19.5	10.7	54.67 ^b
Hyland	24.5	11.7	47.59 ^{bc}
Eurofit	29.0	12.3	42.52 ^{bc}
Capo	22.5	9.0	40.00 ^{bc}
Robigus	21.5	5.0	23.26 ^c
Exklusiv	25.5	1.7	6.51 ^c

water withdrawal and did not produce any seeds (Table 5). Seed number per (main) spike is one of the most important yield components. Big differences between genotypes were observed in the present nursery: 2 Hungarian varieties, i.e. GK Kalász and GK Hunyad, showed a moderate reduction in seeds number in the stress treatment, whereas 3 other varieties could not produce any seeds in their main spike. They showed no tolerance to the applied drought stress at all.

Grain yield

Significant differences among genotypes were obtained for grain yield losses. For all tested varieties grain yield reduction was >50% in the stress treatment. However, 3 varieties, i.e. GK Kalász, GK Fény and GK Hunyad, showed significantly lower yield losses than the majority of varieties. The highest yield losses were observed for 13 varieties, i.e. JB Asano, Midas, Tiger, Element, Pegassos, Brilliant, Eurofit, Eurojet, Hybred, Robigus, Exklusiv, GK Szala and Capo. As already mentioned above Exklusiv, GK Szala and Capo were not able to produce any seeds under the applied water withdrawal treatment (Table 6). From the results it is obvious that the applied life long drought stress had a very strong effect on grain production which was observed also in other studies (BOYER 1982, BRAY 1997, KAUR and BEHL 2010). The most tolerant genotype GK Kalász lost only about 50% of its grain yield, whereas the other genotypes reduced their grain yield significantly and 3 genotypes did not realise any grain yield. Grain yield loss was mainly influenced by the reduction in the number of seeds ($r_s=0.89$, $P<0.0001$).

Table 5: Number of seeds per main spike under two different water regimes and relative seeds number (%) of the water withdrawal treatment compared to the control (well watered) treatment (Varieties with the same letters are not significantly different at $P=0.05$, $LSD_{5\%}=10.39$)

Variety	Control (Ctrl)	Water withdrawal (Wat-)	Relative seeds number (Wat- \times 100/Ctrl)
GK Kalász	32.0	19.7	61.44 ^a
GK Hunyad	56.0	27.5	49.11 ^{ab}
Midas	59.5	21.3	35.85 ^b
Komárom	46.5	16.3	35.12 ^b
Premio	56.0	18.7	33.32 ^{bc}
GK Fény	64.5	21.3	33.07 ^{bc}
GK Csongrád	56.5	18.3	32.44 ^{bc}
Element	51.5	15.7	30.41 ^{bc}
GK Békés	62.5	18.7	29.86 ^{bc}
Bitop	51.5	15.3	29.77 ^{bc}
Hyland	81.0	24.0	29.63 ^{bc}
Tacitus	76.5	21.3	27.88 ^{bc}
GK Rába	66.0	18.3	27.77 ^{bc}
Tiger	36.5	9.0	24.66 ^{bc}
GK Petur	50.5	9.0	17.82 ^c
Brilliant	58.0	8.3	14.36 ^{cd}
JB Asano	58.5	7.0	11.97 ^{cd}
Pegassos	57.5	6.3	11.01 ^{cd}
Hybred	47.0	4.3	9.21 ^{cd}
Eurojet	49.0	3.3	6.80 ^{cd}
Eurofit	62.5	3.0	4.80 ^{cd}
Robigus	55.0	1.3	2.42 ^{cd}
Exklusiv	44.0	0.0	0.00 ^d
GK Szala	14.5	0.0	0.00 ^d
Capo	27.5	0.0	0.00 ^d

Table 6: Grain yield per plant (g) under two different water regimes and relative grain yield (%) of the water withdrawal treatment compared to the control (well watered) treatment (Varieties with the same letters are not significantly different at $P=0.05$, $LSD_{5\%}=10.39$)

Variety	Control (Ctrl)	Water withdrawal (Wat-)	Relative grain yield (Wat- \times 100/Ctrl)
GK Kalász	1.56	0.67	42.95 ^a
GK Fény	2.35	0.78	33.19 ^{ab}
GK Hunyad	2.71	0.87	32.10 ^{ab}
Premio	2.37	0.74	31.22 ^b
Komárom	1.68	0.50	29.76 ^b
GK Csongrád	1.95	0.57	29.23 ^{bc}
GK Békés	2.67	0.64	23.97 ^{bc}
Hyland	2.75	0.64	23.27 ^{bc}
GK Rába	2.73	0.59	21.61 ^{bc}
Bitop	2.01	0.42	20.90 ^{bc}
GK Petur	1.86	0.38	20.43 ^{bc}
Tacitus	2.74	0.49	17.88 ^c
JB Asano	2.13	0.33	15.49 ^{cd}
Midas	2.01	0.27	13.43 ^{cd}
Tiger	1.72	0.22	12.79 ^{cd}
Element	1.41	0.18	12.77 ^{cd}
Pegassos	1.73	0.10	5.78 ^d
Brilliant	1.80	0.09	5.00 ^d
Eurofit	1.72	0.08	4.65 ^d
Eurojet	1.33	0.06	4.51 ^d
Hybred	1.16	0.05	4.31 ^d
Robigus	1.52	0.02	1.32 ^d
Exklusiv	1.30	0.00	0.00 ^d
GK Szala	0.67	0.00	0.00 ^d
Capo	0.68	0.00	0.00 ^d

Acknowledgements

This project was supported by CORNET (Collective Research NETWORKing) and financed in Austria by FFG and Saatgut Österreich, and in Germany by AiF, BMWi and the German Federation of Private Plant Breeders. The Hungarian authors would like to thank for the financial support of the CORNET_6_08_WHEATSTR project by the NKTH (National Office for Research and Technology; egr. numb.: OM-00887/2009) and to express their gratitude to E. Búza, S. Vajajdi-Nagy, S. Palaticki, and F. Markó for their conscientious work.

References

- BOYER JS, 1982: Plant productivity and environment potential for increasing crop plant productivity, genotypic selection. *Science* 218: 443-448.
- BRAY E, 1997: Plant responses to water deficit. *Trend Plant Sci* 2: 48-54.
- BRAY E, BAILEY-SERRES J, WERETILNYK E, 2000: Responses to abiotic stresses. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (Eds.), *Biochemistry & molecular biology of plants*, pp. 1158-1203. Am Soc Plant Biol, Rockville, MD.
- BRODRIBB TJ, HOLBROOK NM, 2003: Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits *Plant Physiol* 132 4: 2166-2173.
- CLARKE JM, McCAIG TN, 1982a: Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop Sci* 22: 503-506.

- CLARKE JM, McCAIG TN, 1982b: Excised-leaf water-retention capability as an indicator of drought resistance of *Triticum* genotypes. *Can J Plant Sci* 62: 571-578.
- CSEUZ L, PAUK J, LANTOS C, KOVACS I, 2009: Wheat breeding for drought tolerance. (Efforts and results). Proc 8th Alps-Adria Sci Workshop, 27 Apr - 2 May, Neum, Bosnia-Herzegovina. *Cereal Res Commun* 37, Suppl 1: 245-248.
- KAUR V, BEHL RK, 2010: Grain yield in wheat as affected by short periods of high temperature, drought and their interaction during pre- and post-anthesis stages. *Cereal Res Commun* 38: 514-520.
- KAUR V, BEHL RK, SINGH S, MADANAN S, 2011: Endosperm and pericarp size in wheat (*Triticum aestivum* L.) grains developed under high temperature and drought stress conditions. *Cereal Res Commun* 39: 515-524.
- LAWLOR DW, 2002: Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: Stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Ann Bot* 89: 871-885.
- MARTINEZ JP, LEDENT JF, BAJJI M, KINET JM, LUTTS S, 2003: Effect of water stress on growth, Na⁺ and K⁺ accumulation and water use efficiency in relation to osmotic adjustment in two populations of *Atriplex halimus* L. *Plant Growth Regul* 41: 63-73.
- MAJER P, SASS L, LELLEY T, CSEUZ L, VASS I, DUDITS D, PAUK J, 2008: Testing drought tolerance of wheat by a complex stress diagnostic system installed in greenhouse. *Acta Biol Szeged* 52: 97-100.
- McCAIG TN, ROMAGOSA I, 1989: Measurement and use of excised-leaf status in wheat. *Crop Sci* 29: 1140-1145.
- MEDRANO H, ESCALONA JM, BOTA J, GULIAS J, FLEXAS J, 2002: Regulation of photosynthesis of C-3 plants in response to progressive drought: Stomatal conductance as a reference parameter. *Ann Bot* 89: 895-905.

- MORI M, INAGAKI M. N, INOUE T., NACHIT MM, 2011: Association of root water-uptake ability with drought adaptation in wheat Cereal Res Commun 39: 551-559.
- PASSIOURA JB, 2002: Soil conditions and plant growth. Plant Cell Env 25: 311-318.
- PINTO RS, REYNOLDS MP, MATHEWS KL, MCINTYRE CL, OLIVARES-VILLEGAS JJ, CHAPMAN S, CHAPMAN SC, 2010: Heat and drought adaptive QTL in a wheat population designed to minimize confounding agronomic effects. Theor Appl Genet 121: 1001-1021.
- SCOTT P, 2000: Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. Ann Bot 85: 159-166.

Note: The online version of the proceedings includes the figure in colour. It can be downloaded either from the homepage of the meeting (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/> - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchertagung - Saatzüchertagung 2011) or requested from the corresponding author.

Influence of different water supply on yield parameters and quality of winter wheat

Clemens Flamm^{1*}, Caroline Engel¹, Elisabeth Zechner²,
Maren Livaja³, Michael Schmolke³ and János Pauk⁴

Abstract

In 2010 and 2011 25 winter wheat varieties were cultivated under water stress and irrigated conditions at two Austrian and one Hungarian location. Generally, yield and yield parameters were influenced negatively by drought stress. Protein content, sedimentation value, maximum resistance and dough energy in the extensogram as well as baking volume were mostly positively influenced under dry conditions. Test weight reacted only at one site in 2010. Decrease of test weight was negatively correlated with the date of ripening of the varieties. In the high quality group the varieties Bitop and GK Kalász diminished their yield in the smallest way. This was due to smaller reductions of the thousand kernel weight in comparison to other varieties. Komarom and GK Petur reached the highest yield in the rainfed and irrigated trials. Bitop and GK Kalász showed the least increase in their protein content and sedimentation value. Exklusiv, GK Békés and Bitop reached the highest protein content under both conditions. Bitop and Exklusiv had the best protein quality. In the medium quality group, the yield and protein content of Brilliant reacted the least. For the breeder the most interesting varieties concerning drought tolerance are Bitop in the high quality group and Brilliant in the medium quality group.

Keywords

Baking quality, drought stress, protein, *Triticum aestivum*, yield

Introduction

Higher temperatures and irregular or low precipitation influence the agriculture directly. That is why in October 2009 the CORNET research project *Winter wheat cultivars maintaining high yield under environmental stress* was started with a view to the effects of climate change. The whole project was divided in three different work packages: field trials, quality aspects and mapping of QTLs for drought tolerance. This paper reports some results of the quality part, nevertheless yield and yield parameters will also be presented. The following research questions were defined: are there influences of water supply on yield components and

quality parameters? Do the tested varieties react differently to the two levels of water supply? What are the consequences for breeding regarding the results?

Materials and Methods

In 2010 and 2011 25 winter wheat varieties were cultivated at two Austrian locations, i.e. Breitstetten and Tattendorf, in the Pannonic region and at one Hungarian site, i.e. Szeged. At each location the varieties were cultivated in the natural precipitation surrounding and, additionally, in an irrigated form. The irrigation treatments were the following: 40-58 mm supplementary water divided into two parts in Austria and 10 mm in Hungary in 2010, and 80-90 mm in Austria and 44 mm in Hungary divided into three and four parts, respectively, in 2011. The selected varieties represented a wide range of baking quality. Each of the participating countries, i.e. Austria, Germany and Hungary, proposed eight genotypes. Capo was selected as supplementary check variety. The field experiments were arranged as lattice designs with three to four replications. Plot size varied from 6.5 m² (Hungary) to 12.5-13.5 m² (Austria). In Austria nitrogen fertilization ranged in total from 93 to 140 kg N ha⁻¹ divided into three doses on each location, in Hungary 100 kg N ha⁻¹ divided into two doses were applied.

The following quality parameters were analyzed: thousand kernel weight (g, 86% d.m.), hectolitre weight (kg, ISO 7971-2), protein content (% d.m., Dumas-method ICC Standard Method 167; N×5.7) and Zeleny sedimentation value (ml, ICC Standard Method 116). According to OBERFORSTER et al. (1994) the 25 varieties were divided into three quality groups (high baking quality, medium baking quality, feed wheat). Extensogram and baking tests were carried out for eight varieties.

Results

From *Figure 1* it is obvious that in the high quality group the varieties Komarom, Element and GK Petur had the highest differences in yield with changing water supply. Bitop and GK Kalász reacted the least. In the medium quality group the varieties Tiger, GK Szala and Eurojet reduced their yield in the rainfed conditions from about 10 to 7 dt ha⁻¹, while Pegassos, Tacitus and Brilliant showed smaller differences in grain yield between the irrigated and rainfed treatment.

¹ Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

² Saatzucht Edelhof, Edelhof 1, A-3910 ZWETTL

³ Technische Universität München, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, Emil Ramann Straße 4, D-85354 FREISING

⁴ Cereal Research Non-Profit Company, Department of Biotechnology, PO Box 391, H-6701 SZEGED

* Ansprechpartner: Clemens FLAMM, clemens.flamm@ages.at

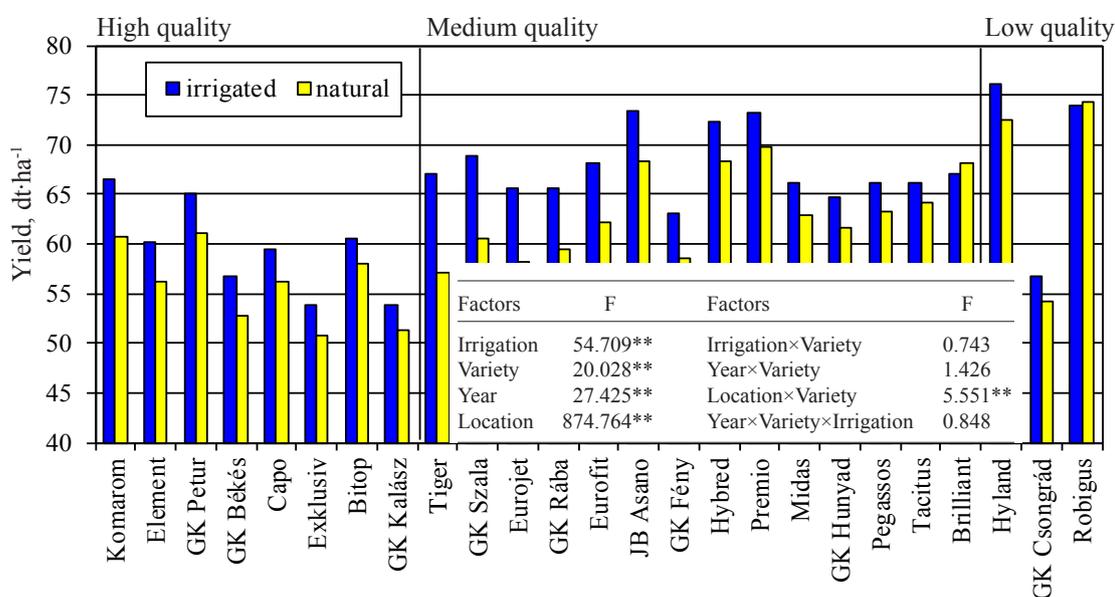


Figure 1: Reaction in grain yield of 25 winter wheat varieties to different water supply (means of 2 locations 2010 and 3 locations 2011; ordered by decreasing differences between rainfed and irrigated trials)

In the low quality group the differences were small for all varieties. In the analysis of variance the factors irrigation, variety, year and location were all significant. In regard to the interactions only the location by variety interaction was significant. This means that the reaction of varieties concerning water supply (irrigation×variety) was statistically not varying.

For the analysis of yield components the varieties were clustered into three groups regarding the predominance of one of the primary yield components (Table 1): varieties with more ears per square meter, varieties which achieve their

yield by a high number of kernels per ear and varieties with a higher thousand kernel weight. No significant differences between the groups were found. In the analysis of variance the factors irrigation and variety were significant. The interaction between location and variety was significant for the parameter ears per square meter.

Most varieties reacted to water deficit by decreasing the primary and secondary yield components. Only a few genotypes reacted by increasing some components. GK Kalász, Komarom, Robigus, Element, GK Hunyad and Tacitus had more ears per m² in the trials with less available water. Capo

Table 1: Reaction and analysis of variance of yield components of 25 winter wheat varieties in regard to reduced water supply (2 locations 2010 and 3 locations 2011 of thousand kernel weight and kernels per square meter; 2 locations 2011 for the other parameters)

	Ears per m ²	Kernels per ear	1000 kernel weight (g)	Kernels per m ²	Ear weight (g)
Capo	-	+	-	-	+
GK Békés, GK Fény	-	-	-	-	-
GK Csongrád	-	+	-	-	+
GK Kalász, Komarom	+	-	-	-	-
Brilliant	-	+	+	-	+
Eurofit	-	+	-	-	-
GK Petur, Hybred	-	-	-	-	-
Hyland	-	+	-	-	-
Robigus	+	-	-	-	-
Bitop	-	-	-	-	-
Element	+	-	-	-	-
Eurojet	-	+	-	-	-
Exklusiv	-	+	-	+	-
GK Hunyad	+	-	-	-	-
GK Rába, GK Szala	-	-	-	-	-
JB Asano, Midas	-	-	-	-	-
Pegassos	-	+	-	-	-
Premio, Tiger	-	-	-	-	-
Tacitus	+	-	-	-	-
Mean	-25	-2.7	-1.9	-1207	-0.2
Irrigation	33.880**	8.279**	19.306**	6.547**	18.679**
Variety	4.248**	6.056**	11.355**	3.275**	2.723**
Irrigation×variety	2.668**	1.157	0.327	0.074	0.634

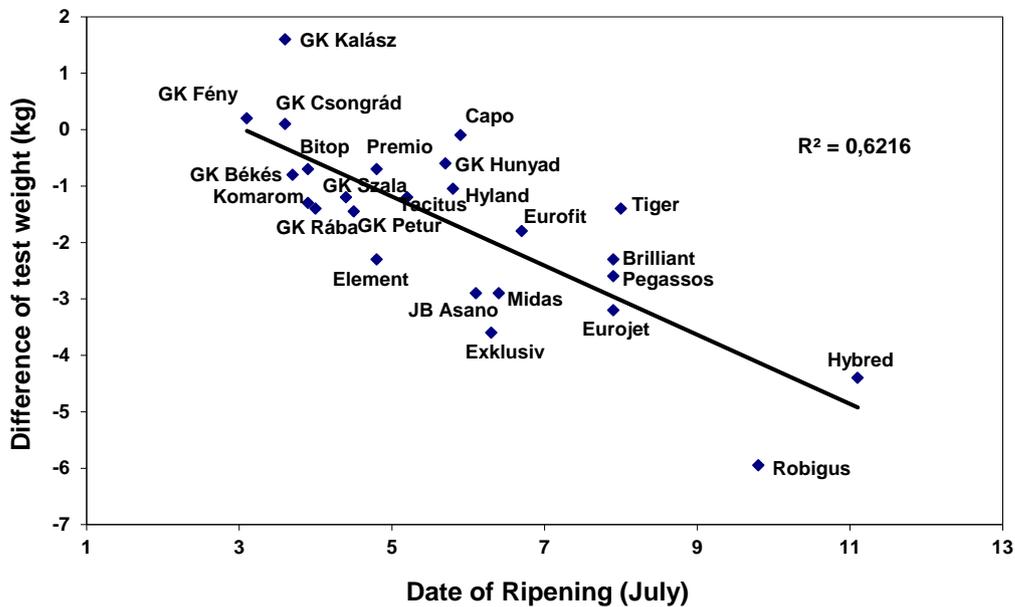


Figure 2: Correlation of the reaction of test weight to reduced water supply (Tattendorf 2010) and the date of ripening (means of 10 trials 2010-2011) of 25 wheat varieties

(-104 ears m⁻²), GK Csongrád (-102 ears m⁻²), Eurojet (-75 ears m⁻²) and Eurofit (-58 ears m⁻²) were the varieties with the greatest differences in ear density between rainfed and irrigated trials. On the other hand these varieties in addition to Brilliant, Hyland, Exklusiv and Pegassos produced more kernels per ear under drought stress. Robigus (-15 grains ear⁻¹), Tacitus (-11 grains ear⁻¹) and Komarom (-10 grains ear⁻¹) showed the greatest differences between irrigated and rainfed trials. An increased thousand kernel weight was only measured for Brilliant. The varieties with the greatest differences were Eurojet (-4.1 g), Pegassos (-3.7 g) and GK Rába as well as Eurofit (-3.6 g), whereas Premio, GK Kalász and Bitop reached approximately the same grain

size in both trials. The number of kernels per square meter decreased with most of the varieties except Exklusiv (+126). Hybred with 2523, Tiger with 2193 and GK Skála with 2011 grains per square meter less showed the greatest differences in grains m⁻² between irrigated and rainfed trials. Robigus, Tacitus and Komarom had from 0.5 g to 0.6 g lighter ears in the rainfed sites than in the irrigated ones. A few varieties achieved a slightly higher ear weight under drought stress (Capo, GK Csongrád, Brilliant).

For test weight no effects of different water supply were found when analysing the mean of all Austrian and Hungarian trials. However, test weight mostly reacts to drought stress just before the harvest. To better demonstrate these

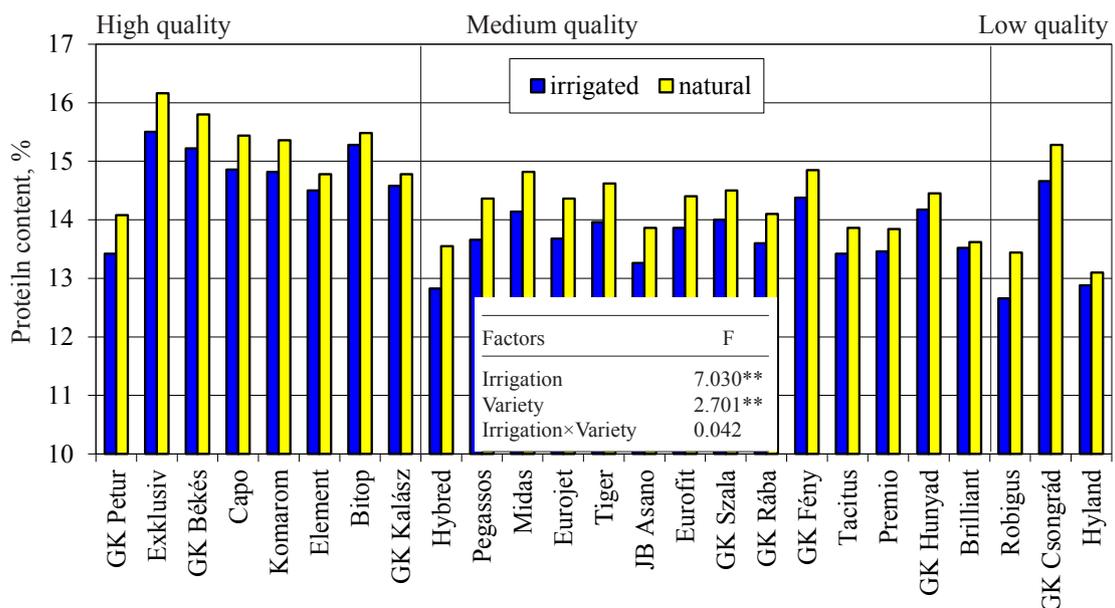


Figure 3: Reaction in protein content of 25 winter wheat varieties to different water supply (means of 2 locations 2010 and 3 locations 2011; ordered by decreasing differences between rainfed and irrigated trials)

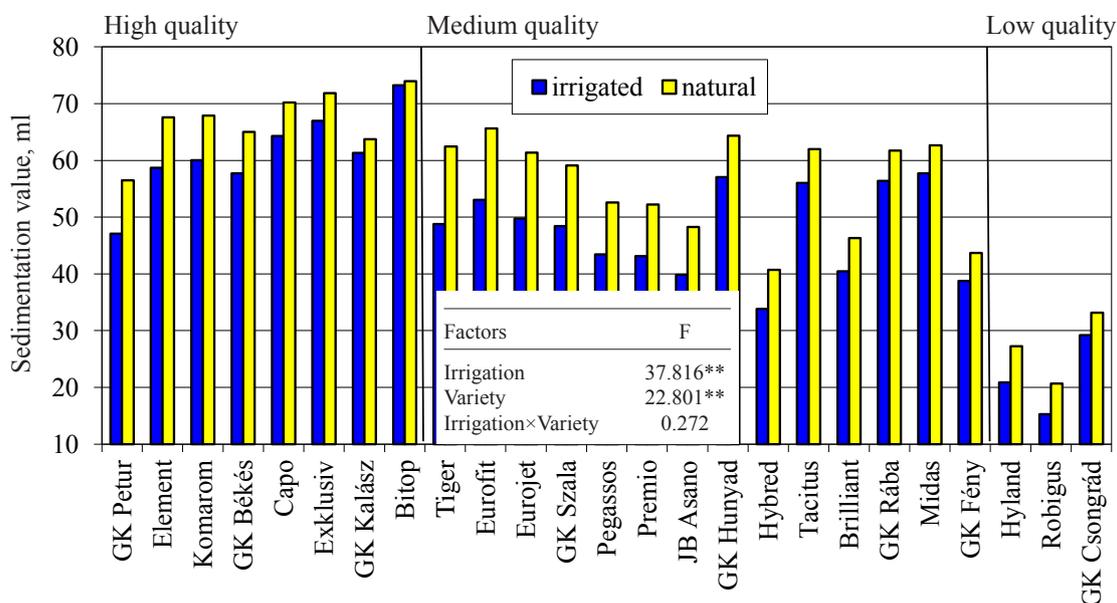


Figure 4: Reaction in sedimentation value of 25 winter wheat varieties to different water supply (means of 1 location 2010 and 2 locations 2011; ordered by decreasing differences between rainfed and irrigated trials)

effects, one trial location (Tattendorf 2010) was selected. There the rainfed trial was heavily stressed some weeks before the harvest. This became obvious by regarding flag leaf senescence data and leaf rolling estimations. In the irrigated trial the effects on these factors was less apparent. By correlating the decrease of test weight of the varieties of this trial with the date of ripening (Figure 2) a significant correlation ($r=-0.79^{**}$) was found. Late maturing varieties like Hybred and Robigus lost -4 to -6 kg test weight, whereas early maturing varieties like GK Fény, GK Csongrád, GK Kalász, GK Békés and Bitop showed the least decreases.

Significant effects of drought stress were observed for protein content resulting in increased protein content (Figure 3). No significant irrigation×variety interaction was found. Robigus, Hybred, Pegassos, Midas, Eurojet, Tiger, GK Petur and Exklusiv increased their protein level by 0.78 to 0.66%. Hyland, Bitop, GK Kalász and Brilliant showed only a 0.22 to 0.10% increase. The highest protein content under both conditions were observed for Exklusiv

(16.2 and 15.5 %). The sedimentation value of all varieties increased significantly as a result of water stress (Figure 4). The variety×irrigation interaction was found to be not significant. Varieties Tiger (+13.6 ml), Eurofit (+12.6 ml), Eurojet (+11.6 ml) and GK Szala (+10.7 ml) reacted more to a reduction in available water than Bitop (+0.7 ml) and GK Kalász (+2.4 ml). The other varieties were in between these extremes. Bitop reached the highest sedimentation values under both conditions (74.0 and 73.3 ml).

Concerning extensogram and baking volume significant effects and tendencies of water availability were observed (Table 2). Dough energy (after 135 min resting time) increased on average by 20 cm². Maximum dough resistance increased on average 58, 80 and 81 EU for 45, 90 and 135 min resting time, respectively. Robigus reacted the most with +253 EU after 90 min resting time. The increase of maximum resistance after 90 and 135 min resting time, however, was not significant. GK Kalász showed only minor effects in response to less available water. Bread volume

Table 2: Reaction and analysis of variance of extensogram parameters and baking volume of 8 winter wheat varieties in regard to reduced water supply (1 locations 2010 and 2 locations 2011)

Variety/Source	Extensogram				Baking volume (ml 100 g ⁻¹ flour)
	Energy (cm ²)	Maximum resistance (EU)			
	135 min	45 min	90 min	135 min	
Capo	+27	+80	+128	+76	+62
Exklusiv	+39	+105	+155	+146	+57
GK Csongrád	+9	+54	+60	+66	+38
GK Fény	+25	-30	-37	+63	-55
GK Kalász	-1	+48	-36	-3	-8
GK Petur	+16	+14	+30	+15	+3
Hyland	+9	+50	+85	+68	+5
Robigus	+33	+145	+253	+217	+90
Mean	+20	+58	+80	+81	+24
Irrigation	7.868**	4.701*	3.696	3.492	3.186
Variety	16.374**	19.032**	16.442**	16.086**	11.769**
Irrigation×variety	0.469	0.500	0.700	0.332	1.467

tended to increase for the rainfed trials, only for GK Fény (-50 ml) and GK Kalász (-8 ml) a reduced baking volume was measured.

Intervarietal correlation analyses between yield decreases after drought stress and yield as well as quality parameters showed no significance.

Discussion

Grain yield is negatively influenced by drought (FOULKES et al. 2007, ARAUS et al. 2008, KHAN et al. 2010). Like in the present study Bitop and Exklusiv showed the lowest yield reduction under drought stress also in another nursery (OBERFORSTER and FLAMM 2007). In the present study the varieties Bitop and Exklusiv showed the lowest yield reduction under drought stress. Generally, besides grain yield all yield components decrease with decreasing water availability (DUGGAN et al. 2000, ESKANDARI and KAZEMI 2010). Analysis of variance in the present study clearly demonstrated that yield and its components were affected by irrigation. Irrigated plants reached higher values for the investigated yield traits. These results were valid for each cluster of varieties with a different emphasis on yield components which means that no yield component is more tolerant against drought stress. No significant irrigation by variety interaction was determined for all yield parameters, except ear density. In the present study ear density was generally low.

Protein content and sedimentation value were positively influenced by water stress. FOIS et al. (2011) described positive effects of drought stress on protein content in durum wheat. BALLA et al. (2011) reported reductions in the inextricable polymeric protein fraction and glutenin-to-gliadin ratio in wheat due to drought and heat stress, despite a higher protein content. EISVAND et al. (2006) and HRSTKOVA and VEJRAZKA (2010) reported increased protein content, Zeleny sedimentation value and gluten content under drought. Contrary BALLA and VEISZ (2007) reported an increased protein content but lower Zeleny values. This may be explained by a different interaction of heat and drought stress.

Acknowledgements

This project was framed by CORNET (Collective Research NETworking) and financed in Austria by the Austrian Research Promotion Agency (FFG), Saatgut Österreich and the breeding companies Saatzucht Donau GesmbH & CoKG and Saatzucht Edelhof. In Germany the project

was supported by the German Federation of Private Plant Breeders (GFP) and financed by the German Federation of Industrial Research Associations (AiF) and the Ministry of Economics and Technology (BMW). In Hungary the financing partners were the National Office for Research and Technology (NKTH) and the Hungarian Seed Association.

References

- ARAUS JL, SLAFER G, ROYO C, SERRET MD, 2008: Breeding for yield potential and stress adaptation in cereals. *Crit Rev Plant Sci* 27: 377-412.
- BALLA K, VEISZ O, 2007: Effect of heat stress and drought on the grain quality of wheat. *Acta Agron Ovariensis* 49: 451-455.
- BALLA K, RAKSZEGI M, LI Z, BEKES F, BENCZE S, VEISZ O, 2011: Quality of winter wheat in relation to heat and drought shock after anthesis. *Czech J Food Sci* 29: 117-128.
- DUGGAN BL, DOMITRUK DR, FOWLER DB, 2000: Yield component variation in winter wheat grown under drought stress. *Can J Plant Sci* 280: 739-745.
- EISVAND HR, AHMADI A, BUSHEHRI AAS, POOSTINI K, JAHAN-SOOZ MR, 2006: Effect of drought stress and timing of nitrogen application on N remobilization, bread-making quality and the pattern of storage proteins in wheat grains. *Iran J Agric Sci* 36: 1489-1497.
- ESKANDARI H, KAZEMI K, 2010: Response of different bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes to post-anthesis water deficit. *Not Sci Biol* 2: 49-52.
- FOIS S, SCHLICHTING L, MARCHYLO B, DEXTER J, MOTZO R, GIUNTA F, 2011: Environmental conditions affect semolina quality in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum* L.) cultivars with different gluten strength and gluten protein composition. *J Sci Food Agric*. 91: 2664-2673.
- FOULKES MJ, SYLVESTER-BRADLEY R, WEIGHTMAN R, SNAPE JW, 2007: Identifying physiological traits associated with improved drought resistance in winter wheat. *Field Crop Res* 103: 11-24.
- HRSTKOVA P, VEJRAZKA K, 2010: Effects of drought on grain quality parameters in winter wheat. *Proc 9th Alps-Adria Sci Workshop, Soil Relations*, 12-17 Apr, Špičák, Czech Republic. *Novenytermeles* 59, Suppl 1: 219-222.
- KHAN AJ, AZAM F, ALI A, 2010: Relationship of morphological traits and grain yield in recombinant inbred wheat lines grown under drought conditions. *Pakistan J Bot* 42: 259-267.
- OBERFORSTER M, FLAMM C, 2007: Reaktion eines Weizensortiments auf induzierten Trockenstress. *Vortr Pflanzenzüchtg* 72: 199-202.
- OBERFORSTER M, SCHMIDT L, WERTEKER M, 1994: Bewertungsschema '94 der technologischen Qualität von Weizensorten (Weichweizen). In: Bundesanstalt für Pflanzenbau (Hrsg.), *Jahrbuch 1993*, pp. 257-280. Bundesamt und Forschungszentrum für Landwirtschaft, Wien.

Note: The online version of the proceedings includes all figures in colour. It can be downloaded either from the homepage of the meeting (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/> - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchertagung - Saatzüchertagung 2011) or requested from the corresponding author.

Characterization of a segregating winter wheat population regarding abiotic stress

Maren Livaja^{1*}, Clemens Flamm², János Pauk³ and Michael Schmolke¹

Abstract

Breeding for cultivars with improved yield stability and high quality under drought stress conditions is one of the most important challenges in time of global climate change. Identification of drought/heat-related QTLs plays a central role in crop improvement through marker assisted selection. Within the Cornet Wheat Stress project a doubled haploid (DH) winter wheat population was used to detect new QTLs associated with tolerance to drought stress specific for European winter wheat. 100 DH lines were grown in the semi-controlled environment of a greenhouse in two seasons, 2009/2010 and 2010/2011. In consideration of a segregation of the used DH population in the *Ppd-D1* locus, QTLs for flag leaf senescence, chlorophyll content and thousand kernel weight were identified.

Keywords

Chlorophyll content, drought stress, flag leaf senescence (FLS), QTL mapping, *Triticum aestivum*

Introduction

The European Union is one of the most significant wheat producers in the world. Impacts of global climate change also affect winter wheat production in Central Europe and are projected to become more severe. Extreme weather events like heat waves and drought seasons are expected to become more frequent and intense. Regions most prone to an increase in drought risk are the Mediterranean Basin and widespread regions of Central and Eastern Europe. In order to continue the leading position of the European Union at the global wheat market it is necessary to develop cultivars with high yield stability and high baking quality even under unfavorable environmental conditions.

Markers associated with tolerance for a variety of environmental stresses rank as important targets for marker-assisted selection (MAS). Efforts to identify quantitative trait loci (QTL) associated with drought using molecular mapping approaches represent an important first step to achieve this goal. Using molecular maps, putative gene loci affecting traits of interest can be detected by testing for statistical associations between marker variants and traits of interest. Once a marker-trait association has been established, MAS reduces the reliance on specific environmental conditions

during the selection, a major hindrance in the conventional breeding of traits influenced by drought.

Material and Methods

Plant material

A winter wheat population of 100 doubled haploid (DH) lines was used in this study. Plants derived from the cross Kerubino×Rainer whose heterozygous offspring was then crossed with SZD7916A (for details see *Figure 1*).

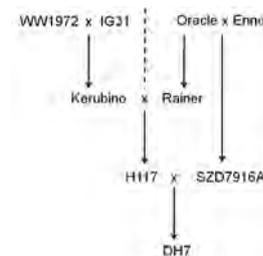


Figure 1: Pedigree of the used DH population (produced by Saaten-Union Biotec GmbH)

Greenhouse experimental design

120 genotypes including parents, grandparents and check lines were used in a randomized lattice design with 2 replications for both treatments. The greenhouse experiments were carried out in two seasons, 2009/2010 and 2010/2011. After sowing in boxes in late autumn, 3 week old plants were vernalized in a greenhouse for 8 to 10 weeks. After an adaptation period, at the beginning of March the boxes were placed on tables in another greenhouse. Two types of sensors were installed in the boxes: a watermark sensor for measuring soil moisture tension, and an EC5 sensor, which measures the water content (%). The sensors were tested in pilot experiments and are suitable for the used substrate. The sensors are connected to a data logger which constantly compares present and desired water content in the boxes and gives an irrigation signal if necessary. The defined treatments were a well watered variant where the EC5 sensor measures 28% water content in the soil, and a stressed variant where the water content is limited to 16%. As starting point for the drought stress application that day was defined, at which for 50% of the plants heading was noticed. Drought stress was continuously applied until harvest.

¹ Technische Universität München, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, Emil Ramann Straße 4, D-85354 FREISING

² Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Sortenwesen, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

³ Department of Biotechnology, Cereal Research Non-Profit Company, P.O. Box 391, H-6701 SZEGED

* Ansprechpartner: Maren LIVAJA, maren.livaja@wzw.tum.de

Phenotyping

Collected phenological data were the following: heading date, flowering time and date of grain maturity. By visual scoring, the percentage of yellow flag leaf area was rated every 2 to 3 days, to estimate the progress in flag leaf senescence (FLS). In order to prevent any bias between operators influencing results, the same person for each experiment carried out the assessments. Thousand kernel weight (TKW) was recorded as yield data. Using SPAD 502 (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japan), chlorophyll meter readings were repeatedly taken at the lower end of the upper third of flag leaves throughout the experiments. For each entry consisting of 2 plants, the average value was accumulated from 8 measures. Stomatal conductance as a measure of the maximum rate of passage of water vapour through the stomatal aperture of flag leaves was recorded with an AP4 leaf porometer (Dynamax, Inc., Houston, TX). The measurements were taken at three dates using four leaves for each entry. In order to estimate the osmotic adjustment (OA) of the different genotypes, flag leaves were sampled three times and placed in distilled water for 4 hours. After rehydration, leaves were wrapped in polyethylene bags and frozen at -20°C until analysis. After thawing at room temperature, cell sap was expressed using a manual leaf press, and the osmotic potential at full turgor (OP100) of the sap was measured by means of a PSYPRO water potential data logger and a C-52 sample chamber (Wescor, Inc., South Logan, UT). Subsequently, the osmotic adjustment was calculated as the difference of the OP100 values measured for well-watered and stressed plants (MOINUDDIN et al. 2005).

Marker analysis and map development

Diversity Array Technology (DArT) marker assays were performed by Triticarte Pty. Ltd. (Diversity Arrays Technology P/L-Triticarte P/L, Yarralumla, Australia). Additionally, the DH population was genotyped using 287 SSR markers. The final marker set included 465 DArT and 96 SSR markers. Genetic linkage mapping was performed with JoinMap 4.0 (VAN OOIJEN 2006). The order of molecular markers along each chromosome was determined using a LOD linkage threshold of 3.0 and recombination frequency threshold of 0.4. Map distances (cM) were calculated using the Kosambi mapping function (KOSAMBI 1944).

Table 1: Variability, variance components and heritability estimates for phenological and grain traits (Level of significance: ** significant at $P \leq 0.01$; * significant at $P \leq 0.05$)

	HD ¹	DA	DGM	DGM-HD	TKW	FLS	SPAD
Minimum	97.1	100.8	141.9	29.1	20.8	8.1	22.2
Maximum	139.9	145.0	185.3	65.9	60.7	100.0	58.1
Variance components							
Genotype	62.6**	59.8**	32.5**	5.3**	26.0**	280.8**	5.6**
Treatment	119.2**	131.6**	147.1**	1.4**	16.9**	709.1**	2.5**
Year	4.9**	4.8**	0.11*	3.4**	2.3**	74.1**	0.1**
G×T×Y	3.9**	3.6**	2.5**	5.0**	5.8**	186.6**	1.3**
Heritability	97.44	97.36	94.72	69.71	88.03	80.22	77.37

¹ HD, heading date; DA, date of anthesis; DGM, date of grain maturity; DGM-HD, time between heading and grain maturity; TKW, thousand kernel weight; FLS, flag leaf senescence; SPAD, chlorophyll content

Statistical and QTL analysis

First, the dataset of each treatment was statistically analyzed separately to determine the significance of differences between genotypes. Estimation of correlation coefficients and analysis of variation was performed using Plabstat (University Hohenheim, Stuttgart, Germany), to identify significant genotype by environment interaction and replicate structure for all analyzed traits. Unlinked and redundant markers were eliminated from the dataset prior to interval mapping. QTL were detected and mapped on winter wheat chromosomes by performing simple interval mapping (SIM) analysis using PlabQTL (University Hohenheim, Stuttgart, Germany) with a significance value at the 0.01 confidence level defined as a minimum LOD threshold for each trait in SIM.

Results

Phenotypic and correlation analysis

Summarizing the results of the measurements, the equipment used to estimate the stomatal conductance and the osmotic potential was not suitable for our greenhouse experiments. Beside the electromagnetic susceptibility, the porometer is especially sensitive at low values for stomatal conductance which are mostly present in drought stressed plant leaves. It needs up to 10 minutes to take one measure. Finally, a repeatability of 0 to 7% between the 2 replications of the stress treatment was reached. For the psychrometer scanner, the effort to receive one value likewise is much too high. Pressing out the leaf sap, loading, measuring and subsequent cleaning of the equipment take about 5 minutes for one leaf. With 480 entries in the greenhouse 40 hours are used for one sampling day. For the osmotic potential measurement, the repeatability was between 0 and 5% between the 2 replications of the stress treatment. In consequence, we excluded the stomatal conductance and the osmotic potential from further analysis. The chlorophyll measurements were satisfying; here we received a repeatability of about 70%.

Analysis of variance showed significant effects of genotypes and treatments for all investigated traits at $P < 0.001$ (Table 1). Also the years influenced the phenotypic traits significantly. This can be explained by the weather conditions, especially the number of sunny hours, which differed strongly between

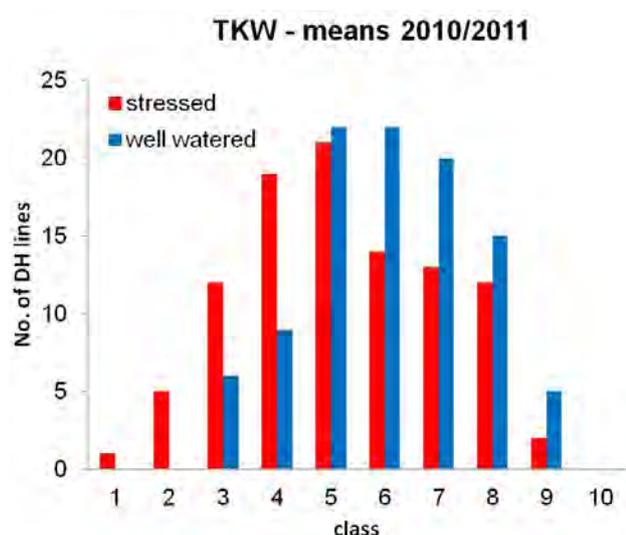


Figure 2: Frequency distribution of thousand kernel weight for both treatment variants in two experimental years

the years. The genotype by environment (treatment) interaction effects were significant for the phenological traits, TKW as well as chlorophyll content and FLS. Further, we observed significant interactions between genotype, treatment and year at a level of significance of $P < 0.001$. Heritability for phenological data calculated across all experiments was between 0.95 and 0.97. Heritability estimates for TKW, FLS and chlorophyll content across all experiments were 0.88, 0.80 and 0.77, respectively.

The significance of the treatment effect as shown in the analysis of variance was visualized for TKW (Figure 2). During evaluation of the frequency distribution, mean values for the TKW of both experimental years were divided into 10 classes. The number of DH lines was counted for each TKW class, separately for both treatments. Resulting from the distributions, the TKW of the stressed variant was shifted to the left, meaning that the TKW was clearly reduced compared to the well-watered treatment.

Investigating the correlations between different phenotypic traits, we observed differences between the well watered and the stress variant (Table 2). The phenological traits

heading date, flowering and grain maturity showed a high and positive correlation one with another in both treatments. The duration from heading to grain maturity was negatively correlated with phenological data and higher in the stress variant. That means, the later the heading occurs the shorter was the period until grain maturity. The correlation of TKW with heading date is positive, meaning that later genotypes have a higher TKW. Regarding chlorophyll content and flag leaf senescence, we found that the later the heading occurs the higher was the chlorophyll content and subsequently the lower was FLS at the same time. Furthermore, the more chlorophyll was measured for one line, the higher was the TKW at the end. And also, the stronger the senescence is in progress the lower is the TKW at the end. This last mentioned behavior was not observed for the well watered variant and corresponds to the already known stay green effect (VERMA et al. 2004).

Genetic map

In order to discover new QTLs associated with tolerance to drought stress specific for European winter wheat the DH population was genotyped using SSR and DArT markers. Altogether, 287 SSR markers were screened for polymorphism. The resulting 96 polymorphic SSRs and further 465 polymorphic DArT markers were used to genotype the 100 DH lines. Based on these marker data a genetic map was developed which contains 244 markers and encompasses 1691 cM with an average marker interval of 6.9 cM. This relatively low marker density is rooted in the selection of ancestors of the DH population (Figure 1). The varieties Rainer and SZD7916A are sister lines, this fact led to a low degree of polymorphism and subsequently to a low genetic resolution. Based on this map the QTL analysis was realized.

QTL analysis

At first we analyzed the whole DH population using all phenotypic data with the exception of stomatal conductance and osmotic potential. The result of QTL analysis were two single QTLs on the short arms of chromosome 2A and 2D which were identified for all investigated traits. These are the well-known QTL for flowering time were the major

Table 2: Correlation analysis between phenological and grain traits in the well watered and stress variant 2011 (Level of significance: ** significant at $P \leq 0.01$; * significant at $P \leq 0.05$)

Variable	HD ¹	DA	DGM	DGM-HD	TKW	SPAD
Well watered						
DA	0.969**					
DGM	0.901**	0.914**				
DGM-HD	-0.319**	-0.226*	0.115			
TKW	0.353**	0.352**	0.376**	0.031		
SPAD	0.409**	0.396**	0.468**	0.069	0.157	
FLS	-0.752**	-0.737**	-0.763**	0.065	-0.297**	-0.513**
Drought stress						
DA	0.991**					
DGM	0.951**	0.951**				
DGM-HD	-0.747**	-0.723**	-0.508**			
TKW	0.757**	0.740**	0.687**	-0.630**		
SPAD	0.897**	0.889**	0.878**	-0.615**	0.750**	
FLS	-0.921**	-0.914**	-0.906**	0.624**	-0.751**	-0.958**

¹ abbreviations see Table 1

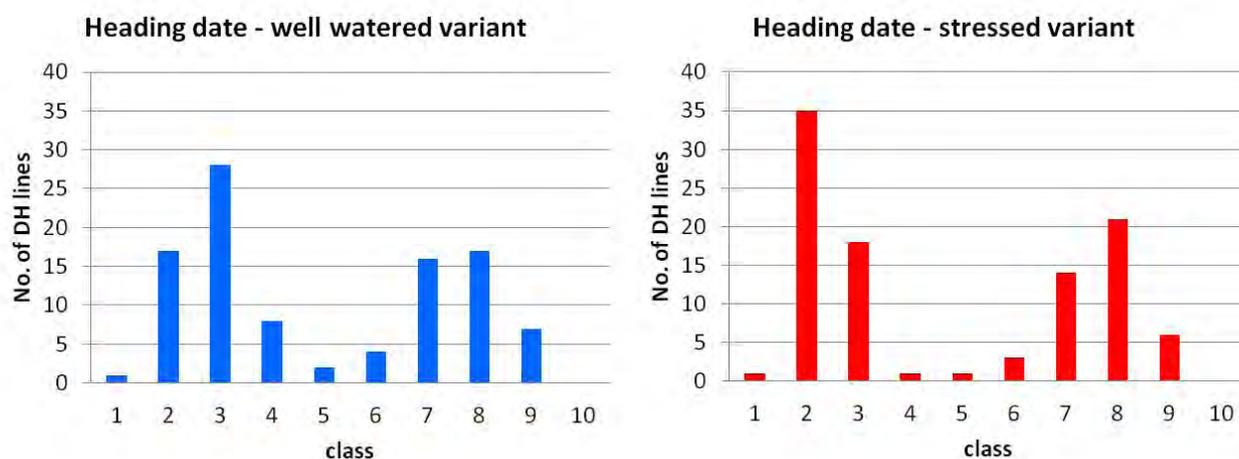


Figure 3: Frequency distribution of the heading date for both treatment variants

genes controlling photoperiod response, the *Ppd* genes *D1* and *A1*, are located. Apparently these genes are segregating in our DH population.

Investigating the distribution of traits, no normal distribution was observed but two peaks for the phenological parameters heading, flowering time and date of physiological grain maturity as exemplarily shown for heading date (Figure 3). This was the case in both experimental years for both treatments. In order to identify anyhow QTL for drought tolerance in our population we decided to use subpopulations.

Using the means of both treatments for heading date, again classes were calculated (Figure 4). Summarizing, the heading was spread to 27 days, with 5 days between the two peaks at which no heading for any line was noticed. The subpopulations were formed using this gap. With exception of one line, exactly the same DH lines belonged to the respective subpopulation in both experimental years. Therefore, this line was excluded from further analysis. The resulting subpopulations contain 54 and 45 lines, respectively. It is important to note, that the drought was applied when for 50% of the plants heading was noticed. Considering that drought realization needs about 1 week, the second (later) subpopulation received the drought stress already before heading and continuously during grain filling.

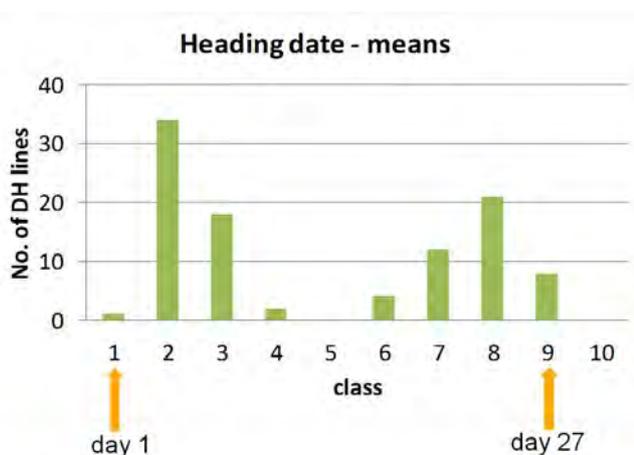


Figure 4: Frequency distribution of the mean heading date from both treatment variants

At a level of significance of 1%, QTL analysis (Table 3) of the first subpopulation (early heading) revealed one QTL for the duration from heading until grain maturity on the short arm of chromosome 1B. This QTL was identified for the well watered variant. From the stress variant a second QTL was identified for flag leaf senescence on the long arm of chromosome 5B. These putative QTL explain 39% and 30% of the phenotypic variance of duration from heading to grain maturity and flag leaf senescence, respectively.

Analyzing the second subpopulation (later heading), for the well watered variant one QTL for the duration from heading until grain maturity was detected on the long arm of chromosome 3A. For TKW one putative QTL was identified on the long arm of chromosome 1A for both treatments. Further some putative QTL for flag leaf senescence were detected, likewise for both treatments. One QTL for flag leaf senescence was identified on chromosome 2D, such a QTL associated with the SSR markers *Xgwm311* and *Xgwm382* was already described by VERMA et al. (2004). A second QTL for FLS is located on the long arm of chromosome 6B. The third QTL for flag leaf senescence was detected on the short arm of chromosome 7A and is associated with the candidate gene 6-SFT which was successfully mapped in our population. The gene encodes a 6-sucrose-fructan fructosyltransferase which is involved in fructan biosynthesis. The expression of 6-SFT is induced by drought stress, and the produced fructan serves as a carbon source for storage but also plays an important role as anti-stress agent (GAO et al. 2010). One fructan fructosyltransferase (FFT) was shown to be associated with a QTL for chlorophyll content on chromosome 6A of durum wheat (DIAB et al. 2008). These 3 QTL for flag leaf senescence explained 38%, 25% and 25% of the phenotypic variation of that trait, respectively. Furthermore, a putative QTL for chlorophyll content was detected on chromosome 7A, but with other flanking markers.

Conclusions

The drop irrigation realized for the greenhouse experiment worked well but the equipment used for measuring water potential and stomatal conductance was not suitable for the experiments. The development of the DH population from

Table 3: QTL for phenotypic traits and associated molecular markers identified from the stress or the well watered variant or from mean of both

Trait ¹	Marker	Chromosome	LOD	Subpopulation	Variant
HD	wpt6105	5B	4.30	1	stress
DGM-HD	wpt2019	1B	5.58	1	well-watered
DGM-HD	wpt2019	1B	5.89	1	mean of both
DGM-HD	wpt1277	3A	5.00	2	well-watered
TKW	wpt6005	1A	7.52	2	stress
TKW	wpt6005	1A	4.87	2	mean of both
FLS	wpt9797	2A	4.52	2	mean of both
FLS	wpt0071	2D	4.80	2	mean of both
FLS	wpt6105	5B	6.50	1	stress
FLS	wpt6105	5B	5.92	1	mean of both
FLS	wpt2991	6B	4.81	2	stress
FLS	wpt2991	6B	5.39	2	mean of both
FLS	6-SFT	7A	5.58	2	well-watered
FLS	6-SFT	7A	4.36	2	mean of both
SPAD	wpt7785	7A	5.06	2	well-watered
SPAD	wpt7785	7A	4.37	2	mean of both

¹ Abbreviations see Table 1

a backcross line led to a very low degree of polymorphism and strongly hindered the effort to develop a genetic map. As a result, molecular markers could not be mapped with high resolution. It could be shown that under dry conditions, flag leaf senescence as well as chlorophyll content have effects on TKW as yield parameter (stay green). Major genes controlling photoperiod response, the *Ppd-D1* and *Ppd-A1* are segregating in our DH population with the effect that flowering time overlaid all other traits of interest. Dividing the 100 DH lines into two subpopulations according to their heading date resulted in the successful identification of several known QTL for FLS. One new putative QTL on chromosome 7A is associated with the candidate gene 6-sucrose:fructan fructosyltransferase which might be implicated in osmotic adjustment during drought stress through the accumulation of fructan.

Acknowledgement

The project was financed by the German Federal Ministry of Economics and Technology (IGF 18EN/1) and coordinated by the GFP. Thanks to following breeding companies and partners for valuable support of the project: Strube Saat-

zucht, Saat-zucht Streng-Engelen, Saat-zucht Josef Breun, Secobra Saat-zucht und KWS Lochow.

References

- DIAB AA, KANTETY RV, OZTURK NZ, BENSCHER D, NACHIT MM, SORRELS ME, 2008: Drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags associated with components of drought tolerance in durum wheat. *Sci Res Essays* 3: 9-26.
- GAO X, SHE MY, YIN GX, YU Y, QIAO WH, DU LP, YE XG, 2010: Cloning and characterization of genes coding for fructan biosynthesis enzymes (FBEs) in *Triticeae* plants. *Agric Sci China* 9: 313-324.
- KOSAMBI DD, 1944: The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172-175.
- MOINUDDIN R, FISCHER A, SAYRE KD, REYNOLDS MP, 2005: Osmotic adjustment in wheat in relation to grain yield under water deficit environments. *Agron J* 97:1062-1071.
- VERMA V, FOULKES MJ, WORLAND AJ, SYLVESTER-BRADLEY R, CALIGARI PDS, SNAPE JW, 2004: Mapping quantitative trait loci for flag leaf senescence as a yield determinant in winter wheat under optimal and drought-stressed environments. *Euphytica* 135: 255-263.
- VAN OOIJEN JW, 2006: JoinMap4, software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kayazama, B.V., Wageningen, The Netherlands.

Note: The online version of the proceedings includes all figures in colour. It can be downloaded either from the homepage of the meeting (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/> - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchtertagung - Saatzüchtertagung 2011) or requested from the corresponding author.

Variabilität und Beziehungen von Samendormanz, Auswuchs und Fallzahl in einem Sortiment europäischer Winterweizen

Variability and relationship of seed dormancy, pre-harvest sprouting and falling number in European winter wheat cultivars

Michael Oberforster^{1*}, Andreas Ratzenböck¹, Manfred Werteker¹,
Anton Neumayer², Elisabeth Zechner³ und Lorenz Hartl⁴

Abstract

The premature enrichment of α -amylases in kernels as a consequence of humid weather during the stage of maturity leads to partial degradation of starch, low falling numbers and pre-harvest sprouting (PHS), resulting in serious economic losses. In the years 2010 and 2011, about 124 cultivars and breeding lines of winter wheat from Germany, Austria and Great Britain were tested on three Austrian locations. The following characteristics were analyzed: dormancy (germination index), germination of intact spikes in a moisture chamber, visual PHS on the field, and falling number. The above mentioned parameters showed a significant genotypic variation. Heritability was consistently high, i.e. 0.81 for the germination index, 0.84 for sprouting in a moisture chamber, 0.91 for the percentage of pre-harvest sprouting in the field, and 0.86 for falling number. However, the intervarietal relation of two germination indexes to visible sprouting under field conditions was weak ($r=0.44^{**}$ and 0.51^{**}). In addition, artificial sprouting in the moisture chamber was not sufficient as a single selection parameter in breeding for sprouting resistance ($r=0.56^{**}$). The most reliable parameters were the differences in the falling numbers from different locations during unfavourable weather conditions. The coefficient of determination between falling number and visible sprouting varied for different trials in the range $R^2=0.74-0.92$.

Keywords

Dormancy, falling number, germination index, pre-harvest sprouting, *Triticum aestivum*

Einleitung

Unter Auswuchs im eigentlichen Sinne (PHS, *pre-harvest sprouting*) versteht man die Keimung physiologisch reifer Körner auf der Ähre noch vor der Ernte. Feuchte Witterung in Verbindung mit geringer Samendormanz sind die Haupt-

gründe dafür. In Österreich gab es im letzten Dezennium mehrmals großflächige Auswuchsschäden und niedrige Fallzahlen. Im Jahr 2005 lag die Fallzahl von 34% und 2008 von 54% des vermarkteten Weizens unter dem Grenzwert von 220 s (SCHÖGGL und KUMMER 2005, KUMMER 2008).

Bei der *pre-maturity- α* -Amylase-Aktivität (PMAA) sind physiologische Änderungen im Korn nicht mit sichtbarem Auswuchs verknüpft. Bei dieser Form wird zwischen früher Teig- und Totreife infolge der Anreicherung von α -Amylase die Stärke teilweise gespalten, was zu verminderten Fallzahlen führt. In Mitteleuropa ist der Auswuchs ökonomisch wesentlich bedeutsamer als die PMAA, da die Mehrzahl der Zuchtstämme mit diesem Defekt nicht zur Zulassung gelangt. Weitere verwandte Mechanismen sind die Keimung unreifer Körner auf der Mutterpflanze (Viviparie oder *pre-maturity sprouting*, PrMS) und die *retained pericarp- α* -Amylase-Aktivität oder RPAA (LUNN et al. 2001, TJIN WONG JOE et al. 2005, MARES und MRVA 2008).

Im Zentrum der nachfolgenden Ausführungen steht der sichtbare Auswuchs (PHS) sowie die damit verbundenen Merkmale. Die wahrscheinlich bei einigen Sorten aufgetretene PMAA wurde von diesen überlagert.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial und Umwelten

In den Jahren 2009/10 und 2010/11 wurden an drei Orten Versuche mit Winterweizen durchgeführt. Es sind dies die Standorte Fuchsenbigl (147 m Seehöhe, Bezirk Gänserndorf), Reichersberg (350 m Seehöhe, Bezirk Ried im Innkreis) und Zwettl (540 m Seehöhe, Bezirk Zwettl). Die Parzellengröße betrug 2,5 m² (Fuchsenbigl), 1,6 bzw. 4,0 m² (Reichersberg) und 3,6 m² (Zwettl). Bei den 124 Genotypen handelt es sich um aktuelle oder ehemals registrierte Sorten unterschiedlichster Backqualität aus Deutschland, Österreich und Großbritannien. Im Sortiment sind einige wenige deutsche und österreichische Zuchtlinien inkludiert. Die Genotypen wurden in zwei Reifegruppen gegliedert und

¹ Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

² Saatucht Donau GesmbH & CoKG, A-4981 REICHERSBERG 86

³ Saatucht Edelfhof, Edelfhof 1, A-3910 ZWETTL

⁴ Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 8, D-85350 FREISING

* Ansprechpartner: Michael OBERFORSTER, michael.oberforster@ages.at

zweifach wiederholt angebaut. Batis, Cubus, JB Asano und Türkis befanden sich sowohl in der frühen als auch in der späten Gruppe (insgesamt 128 Prüfglieder).

Keimungsindex (Dormanz)

Als sich die meisten Genotypen im Stadium der Vollreife (BBCH 89) befanden, wurden von jeder Parzelle etwa 30 Weizenähren entnommen und Kornproben manuell oder mittels Ährendrescher erstellt. Im Jahr 2010 wurden die beiden Sortimente im Abstand von mehreren Tagen beprobt; Reifedifferenzen innerhalb der Gruppen blieben unberücksichtigt. Im Jahr 2011 erfolgte die Probenahme der Sortimente zeitgleich. Die Körner kamen binnen weniger Tage zur Keimanalyse oder lagerten bis zur Aufarbeitung bei -18°C. Nach MARES (1983) konserviert ein rasches Tiefgefrieren trockener Körner den zur Erntezeit vorliegenden Dormanzstatus. Von jeder Parzelle wurden 100 Körner in feuchte Faltenfilter gelegt und gemäß ISTA-Vorschriften ohne Licht und bei einer Temperatur von 20±2°C zum Keimen gebracht (ISTA 2012). Vier Tage nach dem Start des Experiments begann das Auszählen der gekeimten Körner und dauerte, sofern zuvor nicht sämtliche gekeimt hatten, bis zum 21. Tag.

In Anlehnung an WALKER-SIMMONS (1988) wurden gewichtete Keimungsindizes errechnet. Dies sind dimensionslose Zahlen, welche theoretisch zwischen 0 (d.h. kein einziges Korn keimt, absolute Dormanz) und 1,0 (d.h. sämtliche Körner keimen am ersten Tag) liegen. Die beiden Indizes sind lediglich durch die Bezugsbasis verschieden:

$$(a) \quad KIAL = \frac{\sum_{i=1-21} (22-i) \times GK_i}{21 \times ALKO}$$

$$(b) \quad KIGE = \frac{\sum_{i=1-21} (22-i) \times GK_i}{21 \times GEKO}$$

Dabei bedeutet GK_i die Anzahl der am Tag i nach Beginn des Experiments gekeimten Körner, ALKO die Anzahl Körner der Probe (d.h. 100) und GEKO die Summe der gekeimten Körner.

Auswuchs in der Feuchtkammer

Mit dem Erreichen der Vollreife (BBCH 89) wurden jeweils 8 bis 10 ährentragende Halme geschnitten. Wie beim Dormanztest erfolgte 2010 die Beprobung entsprechend der Reifegruppe bzw. im Jahr 2011 zeitgleich. In der verdunkelten Feuchtkammer waren die auf Gitterrosten platzierten Ähren einer konstanten Temperatur von 20±2°C sowie einer weitgehend wassergesättigten Atmosphäre ausgesetzt. Die erste Auswuchsbonitur erfolgte nach 5 bis 7 Tagen, eine weitere 2 bis 3 Tage später. Häufigkeit und Ausprägung sichtbarer Wurzel- und Blattkeime fließen dabei in eine Boniturnote ein. Die Note 1 bedeutet keinen, 5 einen mittleren und 9 einen sehr starken Auswuchs (BFL 2002).

Auswuchs am Feld

Am Standort Fuchsenbigl wurde Schlechtwetter durch eine mehrtägige, von Pausen unterbrochene Befeuchtung

mit Supernet-Sprinklern simuliert. Die Beregnung startete, als die Sorten überwiegend vollreif (BBCH 89) waren. In Reichersberg führte der natürliche Niederschlag in beiden Jahren zu teils gravierendem Auswuchs, am Standort Zwettl gab es nur 2010 schwache Symptome. In der Voll- bis Überreife (BBCH 89 bis 97) wurden parzellenweise 80 bis 100 Ähren zu einem (Zwettl 2010, Reichersberg 2010) oder zwei Terminen (Reichersberg 2011, Fuchsenbigl 2011) entnommen. Von der Prüfung Fuchsenbigl 2011 wurden die beiden Wiederholungen getrennt analysiert, ansonsten handelte es sich um Mischmuster. Davon wurden jeweils 30-35 g untersucht und der Anteil gekeimter Karyopsen in Gewichtsprozent dargestellt. Abweichend von der NORM EN 15587 (DIN 2008) erfolgte die Analyse mit zweifacher Lupenvergrößerung. Im Allgemeinen ist bei ausgewachsenen Körnern das Pericarp über dem Embryo durchbrochen und der Wurzel- oder Blattkeim sichtbar. Beim Ausdreschen der Ähren werden die Keimwurzeln jedoch oft abgetrennt. Körner mit deutlicher Anschwellung im Bereich des Embryos, bei denen sich die Fruchtschale noch nicht geöffnet hat, zählen zur Auswuchsfraction. Die Versuche Fuchsenbigl 2010 und Zwettl 2011 schieden wegen inhomogener Benetzung der Parzellen bzw. hoher, wenig differenzierender Fallzahlwerte aus.

Fallzahl

Die Probenahme entspricht jener für die Ermittlung der Auswuchsprozente. Die Bestimmung der Fallzahl (HAGBERG 1960) erfolgte gemäß ICC Standard Methode Nr. 107/1 (ICC 2011). Allerdings wurde die Vermahlungsmenge anders als vorgeschrieben auf 100 g beschränkt. Für die Vermahlung der Proben wurde eine Schlagkreuzmühle Typ 3100 verwendet.

Statistische Auswertung

Von den Keimungsindizes und der Keimfähigkeit liegen Ergebnisse für 6 Versuche und beide Wiederholungen vor (12 Einzelwerte pro Genotyp). Im Jahr 2010 wurden die Daten der späten mit jenen der frühen Reifegruppe vermengt. Dies erscheint wegen der strikt definierten Methodik sinnvoll, lediglich die Beginnzeit der Keimanalyse war verschieden.

Von Batis, Cubus, JB Asano und Türkis flossen die Daten der frühen Gruppe in die weitere Verwendung ein. Vom Parameter Auswuchs intakter Ähren in der Feuchtkammer gibt es jeweils 24 Einzeldaten (zweimalige Bonitur jeder Wiederholung). Ein direkter Ergebnisvergleich der Reifegruppen von 2010 ist wegen teils variabler Zeitabstände zwischen den Bonituren nicht statthaft. Die Resultate der späten Reifegruppe wurden um die durchschnittliche Differenz der vier doppelt angebauten Sorten korrigiert. Bei den Merkmalen Prozentueller Auswuchs am Feld und Fallzahl von Feldproben weist jedes Prüfglied 8 Datensätze auf; sie werden als separate Umwelten betrachtet. Die Korrelation der Ergebnisse von Einzelstandorten bzw. Mittelwerten erfolgte mit dem Statistikpaket SPSS Vers. 16.0 (SPSS Inc., Chicago). Die Heritabilität, d.h. der genotypische Anteil an der phänotypischen Ausprägung, wurde mit PLABSTAT (Universität Hohenheim, Stuttgart) berechnet.

Ergebnisse und Diskussion

Die Resistenz gegen Auswuchs ist vorrangig eine Funktion von Dauer und Tiefe der primären physiologischen Dormanz. Es handelt sich dabei um einen komplexen Mechanismus der Keimungskontrolle (FINCH-SAVAGE und LEUBNER-METZGER 2006). Das Zusammenwirken von Phytohormonen, insbesondere von Abscisinsäure und Gibberellinen, ist für den Grad der Auswuchsresistenz entscheidend (GORDON 1980, WALKER-SIMMONS und SESING 1987). Weiters nehmen Unterschiede in der morphologischen Struktur der Ähren (KING und RICHARDS 1984) und die Permeabilität von Fruchthülle und Samenschale der Körner Einfluss (BELDEROK 1976). Auch phenolische Substanzen in den Spelzen können zur Keimhemmung beitragen (GATFORD et al. 2002).

Keimungsindex (Dormanz)

Die Keimbereitschaft wird wesentlich von der Temperatur, der Strahlung und Feuchtigkeit während spezifischer Phasen der Kornentwicklung mitbestimmt (LUNN et al. 2001). Bei gegenüber Auswuchswitterung empfindlichen Weizensorten ist die Dormanz vorzeitig aufgehoben. Die Mehrzahl der Körner keimte zwischen dem 5. und 12. Tag nach dem Ansetzen im Faltenfilter, einzelne jedoch erst nach 17 bis 21 Tagen. Niedrige Werte der Keimungsindizes deuten auf eine hohe Dormanz bzw. geringe Auswuchsneigung hin.

Der Keimungsindex KIAL zeigte insgesamt eine Spannweite von 0,10 bis 0,82, im Mittel variieren die Genotypen von 0,32 bis 0,74 (Tabelle 1). Niedrige Werte bzw. eine ausgeprägte Dormanz kennzeichnet die Sorten SW Maxi, Pannonikus, Donnato, Impulsiv, Lahertis, Drifter, Event, Tarkus, Julius, Skalmeje, Jubilar, Lukullus und Ritmo. Als wenig dormant sind Disponent, Hermann, Enorm, Leiffer, Augustus, SZD8220, Brentano, Credo, Mythos, Tambor, Xenos, Solitär und Lear anzusehen (Tabelle 2).

Wird auf die Anzahl gekeimter Körner bezogen (KIGE), resultieren daraus Werte im Bereich von 0,25 bis 0,83 und Sortenmittel von 0,47 bis 0,77. Niedrige Quotienten traten bei SW Maxi, Skalmeje, Drifter, Jubilar, Pannonikus, Tarkus, Lukullus, Lahertis, Donnato, Bussard, Altos, Henrik und Ritmo auf. Hohe Werte zeigten Disponent, Enorm,

Tabelle 1: Spannweite der Einzel- und Mittelwerte von Keimungsindex, Keimfähigkeit, Auswuchs in der Feuchtkammer, Auswuchs am Feld und Fallzahl bei 124 Winterweizen (2010-2011)

Table 1: Range of single values and means of germination index, germination, sprouting in a moisture chamber, PHS in the field and falling number of 124 winter wheat cultivars (2010-2011)

Merkmal ¹	Einzelwerte	Mittelwerte Genotypen	Sortimentsmittel
KIAL	0,10-0,82	0,32-0,74	0,57
KIGE	0,25-0,83	0,47-0,77	0,65
KF (%)	25-100	65-96	87
AUFK (1-9)	1-9	1,9-6,4	3,9
PHS (Gew.-%)	0-83,3	1,7-33,9	10,6
Fallzahl (s)	62-424	65-219	122

¹ KIAL und KIGE, Keimungsindizes (siehe Material und Methoden); KF, Keimfähigkeit (ohne Brechung der Keimruhe); AUFK, Auswuchs Feuchtkammer; PHS, Auswuchs Feld

Kredo, Hermann, Mythos, Brentano, Leiffer, Saturnus, Lear, Solitär, Cubus, SZD8220, Winnetou und Augustus.

Die Reproduzierbarkeit des Keimungsindex KIAL befriedigte wenig; die Korrelationskoeffizienten bewegen sich zwischen $r=0,18^*$ und $0,64^{**}$. Dazu tragen auch die heterogene Witterung der Versuchsumwelten während der Einkörnungsphase bei. Das Programm PLABSTAT weist dennoch eine Heritabilität von 0,81 aus. Beim Index KIGE korrelieren die Werte von $r=0,32^{**}$ bis $0,68^{**}$ (6 Umwelten). Bei potenziell hoher Keimfähigkeit drückt KIAL die Dauer bzw. Tiefe der Dormanz präziser aus und ist zu bevorzugen. Er wird jedoch verfälscht, wenn aufgrund beim Drusch beschädigter Embryonen vermehrt tote oder abnorm gekeimte Körner vorkommen. In jenen Fällen ist KIGE aussagekräftiger.

Der intervarietale Zusammenhang der Keimungsindizes zum prozentuellen Auswuchs ist mit $r=0,44^{**}$ bzw. $0,59^{**}$ zu gering (Tabelle 3), um damit effizient selektieren zu können. Bei höheren Indexwerten (ab 0,55 bis 0,60) ist eine erheblich größere Streuung der Werte um die Regression gegeben als im niedrigen Bereich (Abbildung 1). Mögliche Gründe könnten die im Freiland variable Temperatur und Feuchtigkeit sowie der Tag-Nacht-Rhythmus sein, welche den Abbau von Hemmstoffen und die Keimruhe beeinflussen. Dormanz und Auswuchsresistenz sind miteinander assoziierte, aber keine identischen Prozesse (TRETOWAN 2001, PAULSEN und AULD 2004). Auch die Korrelationen zwischen den Keimungsindizes und der Fallzahl weisen mit $r=-0,56^{**}$ bzw. $-0,60^{**}$ nur ein mittleres Niveau auf. Wesentlich robustere ($r=0,78^{**}$ bzw. $0,79^{**}$) Beziehungen bestehen zum Auswuchs in der Feuchtkammer (Tabelle 3). Es ist anzunehmen, dass bei diesen Parametern die standardisierten Laborbedingungen dafür verantwortlich sind. Die ungewichtet berechnete Keimfähigkeit ist als Schätzwert für die Auswuchsneigung nicht brauchbar.

Auswuchs in der Feuchtkammer

Dieser Test berücksichtigt auch die Wirkung der Ährenmorphologie und Spelzen auf das Auswuchsverhalten (PATERSON et al. 1989). Geringe Keimung in der Feuchtkammer lässt auf hohe Dormanz und dem entsprechende Auswuchsresistenz schließen.

Es gab Boniturdaten im gesamten möglichen Bereich von 1 bis 9; die Genotypen differenzierten im Mittel von 1,9 bis 6,4 (Tabelle 1). Bussard, Skalmeje, Lahertis, Akteur, Pannonikus, SW Maxi, Indigo, Ritmo, Chevalier, Event, Julius, Tarkus und Impulsiv präsentierten sich im Rahmen dieser Methode als auswuchsfest. Dagegen keimten die Sorten Enorm, SZD8220, Hermann, Stefanus, Petrus, Mythos, Ludwig, Carolus, Cubus, Saturnus, Hereward, Disponent und Eurojet bei der hohen Luftfeuchtigkeit in der Kammer stark (Tabelle 2).

Die zeitlich erste Bonitur war über die Umwelten oft nur mangelhaft reproduzierbar. Die Durchschnittswerte beider Beobachtungen korrelieren mit $r=0,28^{**}$ bis $0,69^{**}$ auf mäßigem bis mittlerem Niveau; für die Heritabilität wurde ein Wert von 0,84 bestimmt (6 Umwelten). Der in der Feuchtkammer bonitierte Auswuchs stimmt mit dem Auswuchs am Feld ($r=0,56^{**}$) bzw. der Fallzahl ($r=0,63^{**}$,

Table 2: Mittelwerte von Keimungsindex KIAL, Auswuchs in der Feuchtkammer, Auswuchs am Feld und Fallzahl in einem Sortiment von 124 Winterweizen (2010-2011) (Reihung der Genotypen nach zunehmenden Auswuchs Mittelwert)

Table 2: Mean values of germination index KIAL, sprouting in a moisture chamber (AUFK), PHS in the field and falling number in 124 winter wheat cultivars (2010-2011) (Order of genotypes according to increasing mean of PHS)

Sorte	KIAL ¹	AUFK	Auswuchs am Feld (PHS, Gew.-%)								Mittel	Fallzahl
			Zw10	Re10	Re11a	Re11b	Fu11a	Fu11b	Fu11c	Fu11d		
Impulsiv	0,43	2,50	1,1	3,3	0,5	1,9	0,0	1,8	1,3	3,6	1,7	197
Chevalier	0,51	2,31	0,0	6,2	0,0	0,5	1,2	1,4	3,0	4,2	2,1	219
Lukullus	0,46	2,58	0,3	1,8	0,9	1,2	3,8	2,6	3,4	2,9	2,1	173
Kometus	0,54	2,88	0,1	4,0	1,8	3,1	0,9	2,7	2,2	2,6	2,2	203
Julius	0,46	2,40	0,0	7,8	0,6	2,6	1,3	2,2	2,4	2,1	2,4	184
Energo	0,49	3,50	1,0	5,7	0,5	3,0	2,3	1,3	2,7	2,7	2,4	173
Estevan	0,52	3,63	0,4	7,7	0,4	0,5	2,3	0,0	5,0	3,0	2,4	214
Pannonikus	0,41	2,17	0,5	2,8	1,2	3,0	3,0	2,4	5,1	2,6	2,6	150
Akteur	0,52	2,15	0,0	8,8	0,3	5,4	1,9	1,9	2,3	2,4	2,9	205
Exklusiv	0,57	2,63	0,0	7,7	0,0	4,2	2,3	2,2	2,5	4,6	2,9	206
Drifter	0,44	2,79	0,0	5,8	3,2	7,1	2,4	0,0	4,2	1,5	3,0	195
Ellvis	0,55	2,98	0,0	7,0	0,7	7,8	2,1	1,9	3,9	3,1	3,3	192
Bussard	0,47	1,90	0,2	6,6	2,7	5,3	2,4	1,2	5,3	2,9	3,3	166
SCHW46-96-4a	0,60	3,96	0,0	10,9	0,7	3,1	3,3	2,9	4,9	2,7	3,6	179
SW Maxi	0,32	2,25	0,3	3,8	0,2	1,3	2,0	7,2	3,2	10,4	3,6	184
Event	0,45	2,36	0,2	7,2	1,1	2,6	2,3	1,8	6,9	6,3	3,6	164
Belmondo	0,59	3,67	2,0	7,5	2,4	8,1	2,6	0,5	3,5	2,8	3,7	152
Arnold	0,50	3,38	0,1	6,1	2,3	2,5	4,9	2,1	7,8	5,6	3,9	148
Philipp	0,61	3,71	0,9	5,8	2,5	4,7	4,1	2,3	9,6	3,0	4,1	146
Skalmeje	0,46	1,98	0,0	6,2	2,5	5,4	0,1	9,2	2,3	7,3	4,1	174
Kanzler	0,51	3,29	0,5	13,6	4,9	5,9	3,5	0,0	3,7	1,1	4,2	164
Impression	0,63	4,31	0,2	10,1	0,6	2,1	3,6	8,6	6,3	3,5	4,4	154
Midas	0,55	3,46	0,0	4,0	0,9	0,9	7,8	6,6	9,5	5,6	4,4	164
Mulan	0,52	2,71	0,2	10,9	3,7	6,1	2,5	3,1	4,2	5,3	4,5	153
Atlantis	0,60	4,11	2,8	17,1	0,9	3,3	2,5	1,7	4,5	3,4	4,5	149
Donnato	0,41	2,96	2,0	4,1	4,6	4,4	4,6	6,7	4,9	5,4	4,6	131
Fulvio	0,58	4,75	2,8	8,2	2,1	4,4	6,1	2,5	7,8	3,2	4,6	124
Element	0,47	2,92	0,2	4,8	4,2	11,2	5,3	2,8	5,9	3,2	4,7	129
Lahertis	0,43	2,11	0,0	10,6	0,3	1,3	5,6	7,0	6,6	6,2	4,7	143
Potenzial	0,48	2,52	0,0	5,3	0,5	1,0	1,8	2,3	4,3	22,4	4,7	186
Emerino	0,47	3,75	0,2	3,2	1,0	5,1	5,9	4,4	11,7	7,4	4,9	140
Erla Kolben	0,64	3,67	0,4	9,1	3,0	3,4	6,1	5,2	6,3	6,3	5,0	116
Tamaro	0,52	3,29	2,9	13,6	1,7	5,5	3,2	3,6	4,3	5,7	5,1	145
History	0,57	3,86	0,8	14,5	3,4	3,2	4,2	1,4	6,8	6,9	5,2	131
Kronjuwel	0,62	4,02	0,1	6,8	0,7	3,9	4,9	4,9	10,7	10,0	5,3	156
Plutos	0,59	4,13	1,5	10,6	4,0	4,9	2,1	5,6	4,4	9,0	5,3	133
Toronto	0,63	3,86	2,5	8,0	1,4	7,5	6,3	5,2	6,4	6,0	5,4	138
Ennsio	0,57	4,73	0,0	5,6	1,2	3,7	7,1	5,0	13,2	7,9	5,5	162
Empire	0,50	2,81	0,2	9,1	4,1	4,1	5,8	5,8	9,2	5,8	5,5	118
Antonius	0,51	4,46	5,1	3,3	1,9	2,2	7,4	9,3	9,3	6,1	5,6	125
Romanus	0,56	2,52	0,9	21,7	2,8	4,3	2,9	3,5	2,7	6,4	5,7	127
Papageno	0,51	3,00	1,7	13,7	5,3	9,4	3,7	2,1	6,9	2,7	5,7	123
Schamane	0,52	3,25	0,3	19,1	8,3	11,6	0,4	1,1	3,2	1,9	5,7	168
Achat	0,55	4,11	0,1	14,0	3,7	14,2	5,5	3,3	3,6	5,5	6,2	131
Rainer	0,59	3,21	0,2	15,4	2,5	12,9	6,7	4,1	5,5	4,0	6,4	133
SHW152-01-10	0,59	3,54	1,5	9,9	3,6	11,0	4,1	7,0	6,9	7,6	6,5	119
Henrik	0,47	2,92	0,1	21,0	3,0	9,7	3,6	3,3	3,0	8,2	6,5	154
Format	0,54	3,40	0,0	10,1	5,1	10,0	4,8	6,4	11,2	5,7	6,7	122
Jubilar	0,46	2,75	0,3	12,3	4,1	6,1	16,0	3,0	7,1	5,1	6,8	133
Lucio	0,61	4,17	4,4	12,0	2,3	5,7	5,1	9,1	8,8	7,0	6,8	119
Batis	0,54	2,92	1,0	9,9	3,9	4,7	7,9	7,1	13,3	7,5	6,9	114
Kredo	0,67	4,90	0,8	8,5	3,7	7,4	5,6	10,6	12,1	7,5	7,0	120
Sophyttra	0,62	4,65	1,4	16,2	5,3	14,7	3,4	4,0	5,4	6,2	7,1	116
Caribo	0,60	4,06	0,8	16,7	5,7	7,0	4,0	6,9	5,7	10,0	7,1	106
Altos	0,50	2,58	5,2	13,3	9,8	9,7	3,9	5,2	3,1	6,6	7,1	110
Balaton	0,61	3,92	1,9	14,2	4,0	4,5	7,9	8,5	9,0	7,6	7,2	116
Astron	0,60	3,31	0,2	8,2	4,0	13,1	6,9	5,1	12,7	7,6	7,2	122
Indigo	0,47	2,29	0,0	11,4	9,4	15,3	3,8	3,2	5,9	8,7	7,2	128
Xenos	0,66	5,08	2,8	20,9	1,8	3,5	3,9	6,5	11,7	7,2	7,3	114
Privileg	0,64	4,31	0,3	17,8	5,7	7,7	7,3	4,1	9,9	6,6	7,4	108
Magnus	0,56	4,52	0,0	20,5	4,9	6,6	4,5	4,5	9,0	10,2	7,5	115

Sorte	KIAL ¹	AUFK	Auswuchs am Feld (PHS, Gew.-%)								Mittel	Fallzahl
			Zw10	Re10	Re11a	Re11b	Fu11a	Fu11b	Fu11c	Fu11d		
Dekan	0,56	3,46	0,1	10,4	4,7	8,3	8,8	10,4	10,9	6,8	7,6	109
SE319/07WW	0,53	4,42	5,5	9,3	7,5	7,6	6,0	7,0	9,5	8,6	7,6	94
Terrier	0,55	3,02	0,1	15,6	7,3	11,4	4,9	8,9	6,2	10,8	8,2	107
Eurofit	0,59	3,50	1,2	12,5	6,7	11,5	8,7	7,7	11,8	5,9	8,3	101
Contra	0,57	3,08	0,1	18,6	6,7	9,4	5,2	10,8	6,0	10,6	8,4	120
Toras	0,59	3,44	2,3	34,9	7,6	9,7	2,9	2,4	5,1	2,7	8,5	135
Capo	0,57	4,92	0,6	6,4	3,3	4,5	5,1	16,3	19,8	13,5	8,7	113
Tambor	0,67	4,27	0,1	14,0	6,8	13,3	8,1	7,0	13,2	7,0	8,7	104
Tarkus	0,46	2,40	0,2	13,7	4,3	10,7	6,2	10,0	12,7	12,0	8,7	117
Vulcanus	0,58	5,04	3,3	15,0	4,6	7,2	9,8	9,4	8,4	12,3	8,8	94
Fidelius	0,62	4,17	0,5	29,0	2,4	5,9	9,5	6,3	11,6	7,1	9,0	131
Mythos	0,67	5,90	2,4	29,0	5,9	9,2	7,4	3,1	14,7	5,2	9,6	99
Pireneo	0,53	5,13	9,9	7,2	0,8	1,9	14,1	13,5	20,7	10,1	9,8	115
Saturnus	0,64	5,46	6,7	7,6	2,3	3,5	16,5	9,5	24,6	8,6	9,9	93
Manhattan	0,57	3,96	0,5	9,9	8,2	11,2	15,6	10,8	15,8	8,6	10,1	95
Astardo	0,54	4,58	7,2	14,8	3,4	4,3	14,9	5,7	25,5	6,3	10,3	108
Megas	0,56	4,52	2,5	24,4	8,0	14,2	7,1	6,6	11,0	8,5	10,3	95
Adler	0,53	3,81	3,0	28,4	4,8	7,5	9,6	6,7	11,4	11,2	10,3	109
Ritmo	0,47	2,31	0,2	9,2	4,5	8,7	12,4	21,4	14,7	15,4	10,8	122
Kranich	0,58	3,65	0,0	22,2	5,7	9,3	7,7	18,0	12,6	11,4	10,9	116
Inspiration	0,60	2,81	2,7	10,6	7,7	14,9	10,0	8,3	16,6	16,0	10,9	94
Eriwan	0,51	2,61	0,1	6,2	1,7	7,3	10,0	8,9	22,0	30,9	10,9	132
Solitär	0,66	4,81	0,3	25,1	5,1	8,4	7,4	7,8	20,2	12,8	10,9	114
Monopol	0,55	3,90	0,3	22,2	4,0	9,4	12,1	12,5	11,6	18,8	11,4	111
Brentano	0,67	5,25	4,7	13,0	5,3	16,8	14,9	9,6	15,2	11,7	11,4	92
Leiffer	0,70	4,98	3,7	26,6	2,5	11,6	9,1	5,9	19,0	15,4	11,7	95
Pedro	0,53	3,96	4,0	27,4	5,3	7,0	17,2	5,8	19,5	7,8	11,8	103
Profilus	0,53	4,08	2,2	25,0	8,9	20,0	6,1	9,6	8,9	14,5	11,9	97
Petrus	0,63	5,90	2,6	35,2	10,7	12,1	9,3	8,9	9,1	7,6	11,9	88
SE333/07WW	0,56	3,42	5,7	10,8	16,7	28,0	7,5	9,5	8,3	9,8	12,0	89
Pamier	0,60	4,81	0,3	27,6	1,5	7,0	12,0	14,9	20,2	13,5	12,1	126
Sailor	0,60	3,71	2,7	14,0	7,7	9,0	29,8	8,0	22,2	7,0	12,6	96
Cansas	0,62	4,69	2,9	27,3	10,8	9,9	8,7	8,6	13,7	20,1	12,8	81
Dream	0,58	3,19	0,7	18,9	20,2	20,9	3,5	12,3	15,1	13,3	13,1	96
SZD8220	0,68	6,15	1,7	15,5	5,1	11,0	16,8	9,6	28,1	17,7	13,2	108
Biscay	0,51	3,29	0,1	7,8	6,7	15,1	20,4	10,9	23,3	24,8	13,6	107
Kerubino	0,64	4,46	2,0	20,4	8,5	11,8	20,3	3,5	38,1	5,5	13,8	99
Winnetou	0,65	5,11	0,0	8,7	8,8	8,9	16,5	25,1	27,0	16,4	13,9	107
Tobago	0,55	3,75	2,0	16,5	12,0	17,0	14,3	15,9	23,1	14,5	14,4	82
Enorm	0,70	6,38	0,4	13,0	9,4	13,4	19,8	21,5	25,5	21,1	15,5	93
Disponent	0,74	5,42	4,1	22,0	14,4	24,8	9,7	14,9	11,5	25,0	15,8	82
Aron	0,54	3,54	0,4	11,1	2,8	6,3	20,5	35,0	28,1	31,2	16,9	125
Josef	0,59	3,08	3,6	7,1	9,6	15,3	20,4	24,4	31,0	28,9	17,5	87
Carolus	0,65	5,52	6,4	41,8	24,1	35,3	7,4	6,2	9,0	10,7	17,6	84
Hereward	0,62	5,44	5,0	20,0	17,0	22,8	14,1	21,3	23,9	31,1	19,4	74
Türkis	0,59	3,71	3,8	23,9	17,3	27,2	22,7	17,1	31,9	21,1	20,6	82
JB Asano	0,64	4,92	7,1	28,9	24,1	30,2	28,8	13,2	24,0	19,8	22,0	74
Yello	0,55	4,02	3,2	34,3	17,4	22,4	26,5	10,9	44,1	15,4	21,8	77
Lear	0,65	5,23	2,1	18,3	13,5	17,3	15,6	27,8	37,7	44,6	22,1	75
Augustus	0,69	5,21	12,0	29,2	13,0	32,1	21,2	23,3	22,3	28,1	22,7	72
Tommi	0,58	3,56	5,7	22,8	14,2	14,9	20,9	32,8	45,7	29,5	23,3	80
Butaro	0,62	3,90	2,8	53,4	11,2	17,4	30,3	17,1	37,0	24,0	24,2	84
BAUB469511	0,59	4,52	6,3	46,1	9,4	20,1	17,8	32,8	26,0	40,3	24,9	77
Tabasco	0,58	4,06	2,1	12,7	21,6	26,8	35,3	29,0	45,2	58,9	29,0	77
Ludwig	0,64	5,58	7,3	28,8	16,5	31,2	40,1	34,9	42,0	37,7	29,8	71
Hermann	0,71	6,15	6,0	35,4	21,4	19,5	31,5	36,2	36,5	54,0	30,1	73
Lynx	0,53	4,36	9,4	35,3	13,1	12,2	37,3	33,6	48,7	59,1	31,1	65
Global	0,57	4,73	0,1	21,4	10,4	15,5	30,7	45,8	43,9	83,3	31,4	97
Eurojet	0,63	5,29	5,7	29,7	23,5	41,8	46,0	20,7	60,5	27,1	31,9	74
Stefanus	0,60	5,96	8,5	17,0	20,4	27,1	41,0	46,5	57,1	44,2	32,7	70
Hussar	0,60	4,48	0,2	20,5	23,7	24,6	55,7	50,5	53,1	38,7	33,4	89
Jenga	0,63	5,23	0,9	27,0	15,4	20,7	59,8	21,6	72,1	52,7	33,8	85
Cubus	0,64	5,50	10,2	32,6	25,3	36,5	51,9	39,5	47,4	27,6	33,9	67

¹ KIAL, Keimungsindex (bezogen auf alle Körner); AUFK, Auswuchs in der Feuchtkammer (1-9); Zw10, Zwetl 2010; Re10, Reichersberg 2010; Re11a, Reichersberg 2011-1. Erntetermin; Re11b, Reichersberg 2011-2. Erntetermin; Fu11a, Fuchsenbigl 2011-1. Wh.-1. Erntetermin; Fu11b, Fuchsenbigl 2011-2. Wh.-1. Erntetermin; Fu11c, Fuchsenbigl 2011-1. Wh.-2. Erntetermin; Fu11d, Fuchsenbigl 2011-2. Wh.-2. Erntetermin

Tabelle 3: Intervarietales Korrelationen (r) zwischen Keimungsindex, Keimfähigkeit, Auswuchs in der Feuchtkammer, Auswuchsprozenten am Feld und Fallzahl (124 Winterweizen, 2010-2011)

Table 3: Intervarietal correlations (r) between germination index, germination, sprouting in a moisture chamber, PHS in the field and falling number (124 winter wheat cultivars, 2010-2011)

Merkmal ¹	KIGE	KF	AUFK	PHS	Fallzahl
KIAL	0,95**	0,87**	0,78**	0,44**	-0,56**
KIGE	-	0,69**	0,79**	0,51**	-0,60**
KF	-	-	0,59**	0,28**	-0,41**
AUFK	-	-	-	0,56**	-0,63**
PHS	-	-	-	-	-0,75**

¹ Abkürzungen siehe Tabelle 1; *, ** signifikant bei $P < 0,05$ bzw. $P < 0,01$

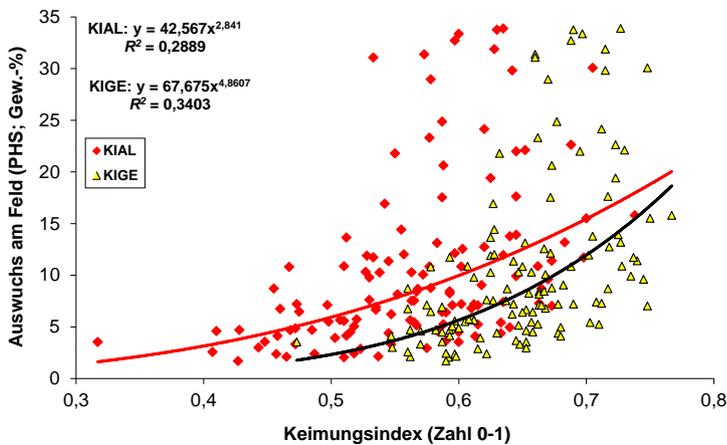


Abbildung 1: Intervarietales Zusammenhänge von Keimungsindex und Auswuchs am Feld (124 Winterweizen, Mittel aus mehreren Umwelten, 2010-2011)

Figure 1: Intervarietal relationship of germination index and PHS in the field (124 winter wheat cultivars, average from several environments, 2010-2011)

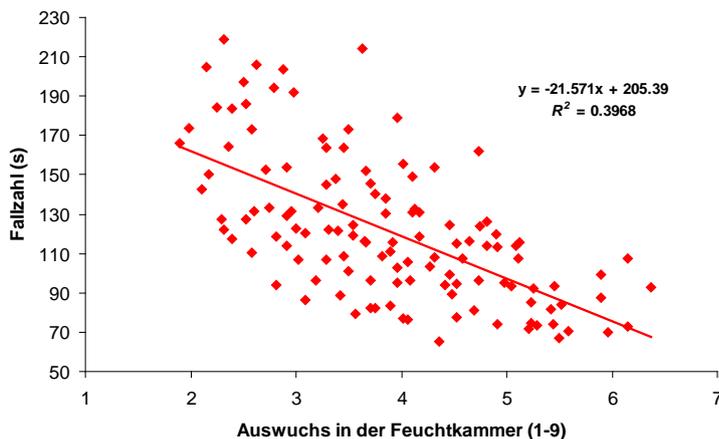


Abbildung 2: Intervarietales Zusammenhänge von Auswuchs in der Feuchtkammer und der Fallzahl von Feldproben (124 Winterweizen, Mittel aus mehreren Umwelten, 2010-2011)

Figure 2: Intervarietal relationship of sprouting in a moisture chamber and the falling number of field samples (124 winter wheat cultivars, average from several environments, 2010-2011)

d.h. $R^2=0,40$) nur mäßig überein (Tabelle 3, Abbildung 2). Die Keimung intakter Weizenähren in der Feuchtkammer ist als alleiniger Parameter für die Züchtung auf Auswuchsfestigkeit nicht genügend treffsicher. Dies deckt sich weitgehend mit Ergebnissen der österreichischen Wertprüfung von Winterweizen. Im günstigsten Fall korrelierten der an Ährenbündeln provozierte Auswuchs und die Fallzahlen von auswuchsgeschädigten Weizenversuchen mit $r=0,50^{**}$ bis $0,80^{**}$ (OBERFORSTER und WERTEKER 2006). Eine enge Beziehung von Feuchtkammer- und Feldauswuchs fanden hingegen WU und CARVER (1999).

Auswuchs am Feld

Der bei natürlichen Bedingungen oder mit Zusatzberegnung erzielte Auswuchs lag in einem weiten Bereich von 0 bis 83%. Auch die Sorten zeigten mit 1,7 bis 33,9% eine beachtliche Variabilität (Tabelle 1). Mitunter war der Auswuchsgrad beim späten Erntetermin niedriger als beim frühen; dies ist durch die kleine Stichprobe von 80 bis 100 Ähren erklärbar. Die Weizensorten Impulsiv, Chevalier, Lukullus, Kometus, Julius, Energo, Estevan, Pannonikus, Akteur, Exklusiv, Drifter, Elvis und Bussard können als gut auswuchstolerant angesehen werden. Vergleichsweise rasch keimten hingegen Cubus, Jenga, Hussar, Stefanus, Eurojet, Global, Lynx, Hermann, Ludwig, Tabasco, BAUB469511, Butaro, Tommi, Augustus und Lear (Tabelle 2).

Die Ergebnisse der Umwelten zeigten eine Übereinstimmung im Bereich von $r=0,36^{**}$ bis $0,93^{**}$. Erwartungsgemäß die schwächste Korrelation gab es zum Versuch mit geringem und wenig differenziertem Auswuchs (Zwettl 2010). Von den vier analysierten Parametern war der Auswuchs unter Feldbedingungen mit einer Heritabilität von 0,91 am besten zu reproduzieren (8 Umwelten). Der Zusammenhang von Auswuchsprozenten und Fallzahl ist unter dem Gesichtspunkt vieler nivellierender Fallzahlwerte zu sehen ($r=-0,75^{**}$). Bessere Aussagen bietet hier die polynomische Kurvenanpassung; das Bestimmtheitsmaß (R^2) für die einzelnen Versuchsumwelten variiert im Bereich von 0,74 bis 0,92 (Abbildungen 3 und 4).

Unter natürlichen Niederschlagsbedingungen entsprach ein Auswuchsgrad von 1% etwa einer Fallzahl von 200 bis 250 s. Bei mehr als 5% sichtbar gekeimter Körner sank die Fallzahl auf 130 bis 180 s ab. Ein Auswuchs von 12 bis 15% bedeutete Werte zwischen 62 und 80 s (Abbildung 3). Bei der künstlichen Beregnung am Standort Fuchsenbigl folgt die Kurve einem davon abweichenden Verlauf. Hier liegen manche Fallzahlen bereits bei 3 bis 5% sichtbarem Auswuchs unter einem Wert von 100 s (Abbildung 4). Der Grund für diese Reaktion könnte in einem zu intensiven Beregnungsregime gelegen sein.

Bei der Probenahme für das Merkmal Prozentu-

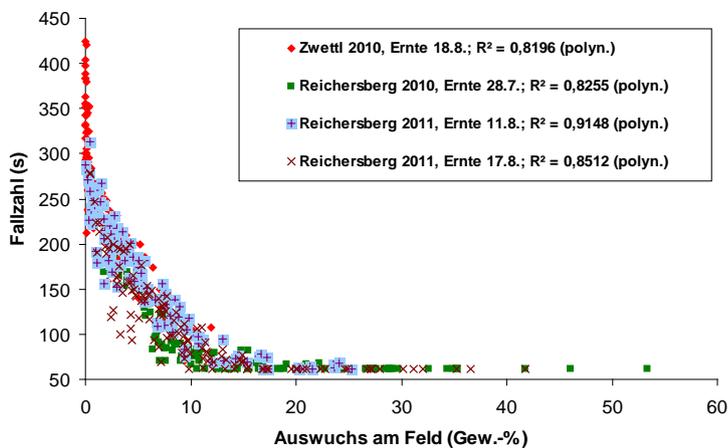


Abbildung 3: Intervarieter Zusammenhang von Auswuchs und Fallzahl bei natürlichen Niederschlagsbedingungen (124 Winterweizen, 4 Umwelten, 2010-2011)

Figure 3: Intervarietal relationship of PHS in the field and falling number for natural rainfall conditions (124 winter wheat cultivars, 4 environments, 2010-2011)

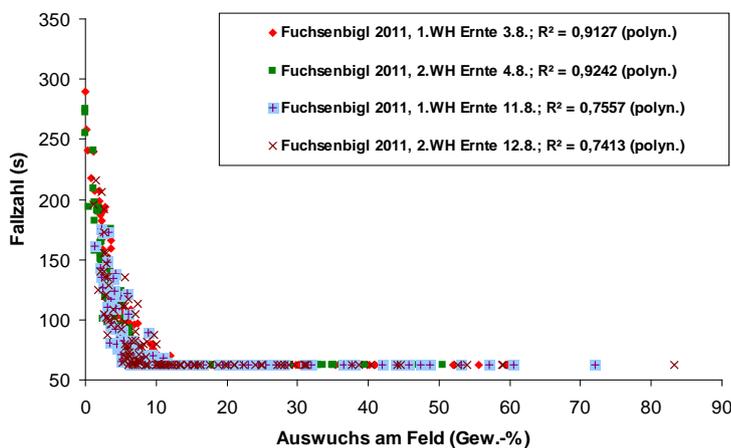


Abbildung 4: Intervarieter Zusammenhang von Auswuchs und Fallzahl nach Beregnung am Standort Fuchsenbigl 2011 (124 Winterweizen, 2 Erntetermine, 2 Wiederholungen)

Figure 4: Intervarietal relationship of PHS in the field and falling number after field weathering on the location Fuchsenbigl 2011 (124 winter wheat cultivars, 2 harvest times, 2 replications)

eller Auswuchs am Feld blieb die Trennung in Reifegruppen unberücksichtigt. Gelegentlich werden Aussagen getroffen, wonach in Versuchen frühreife Genotypen hinsichtlich des Auswuchs- und Fallzahlrisikos gravierend benachteiligt seien. Auch DERERA et al. (1976) weisen auf die negative Korrelation zwischen Reifezeit und Auswuchs hin. In dem hier verwendeten Testsortiment war kein Zusammenhang zwischen Fallzahl und Abreifeverhalten zu beobachten. Das Stadium der Gelbreife (BBCH 87) erreichten die 124 Genotypen im Durchschnitt von 6 Umwelten zwischen dem 14. und 21. Juli. Es gab intervarieter keinen Zusammenhang von Gelbreifedatum und Auswuchs bzw. Gelbreifedatum und Fallzahl.

Fallzahl

In Österreich ist in aktuellen Anbau-Lieferverträgen von Backweizen ein sichtbarer Auswuchs von maximal 1% festgeschrieben. Es gilt, eine Mindestfallzahl von 280 s für Premiumweizen, 250 s für Qualitätsweizen und 220 s für Mahlweizen zu erreichen. Im Allgemeinen akzeptieren die Mühlen Fallzahlen bis 180 s nur in Jahren mit größeren Mengen fallzahlschwacher Partien und mit Preisabschlägen. Die geringe Flexibilität bei der Kontraktgestaltung und das weitgehende Festhalten an starren Grenzwerten werden aus backtechnologischer Sicht durchaus kritisch beurteilt (MÜNZING 2011).

In den ausgewerteten Versuchen traten Fallzahlen zwischen 62 bis 424 s und im Mittel der Genotypen von 65 bis 219 s auf (8 Umwelten). Die durchschnittlich höchsten Werte wurden bei Chevalier, Estevan, Exklusiv, Akteur, Kometa, Impulsiv, Drifter, Elvis, Potenzial, SW Maxi, Julius, Schw46-96-4a, Skalmjeje, Energo und Lukullus gemessen. Niedrige Fallzahlen zeigten Lynx, Cubus, Stefanus, Ludwig, Augustus, Hermann, Eurojet, JB Asano, Hereward, Lear, Tabasco, Yello, BAUB469511 und Tommi (Tabelle 2).

Für die 8 Umwelten variieren die Korrelationskoeffizienten der Fallzahl im Bereich von $r=0,28^{**}$ bis $0,83^{**}$. Die teilweise reduzierte Übereinstimmung ist durch die unterschiedliche Auswuchsbelastung und die Häufung niedriger Werte von 62 bis 80 s in einigen Versuchen bedingt.

Werden im Anschluss an eine regnerische Witterungsperiode bei nicht oder wenig lagernden Weizenparzellen abgesenkte und gut differenzierende Fallzahlen gemessen, sind diese für die Selektion auf Auswuchsresistenz ähnlich wertvoll wie der Prozentsatz gekeimter Körner, jedoch mit weniger Aufwand verbunden. BARNARD et al. (2005) prüften sieben Merkmale und bewerteten die Fallzahl als eines der am besten geeigneten Maße zur Charakterisierung von Auswuchs. Höhere Auswuchsgrade, wie sie in den Versuchen von Reichersberg (2010, 2011) und Fuchsenbigl (2011) auftraten, sind mit der Fallzahl teilweise nicht mehr zu unterscheiden. Dagegen hat die

Fallzahlmethode den Vorteil, dass damit auch Genotypen mit erhöhter PMAA erkannt werden. Nach MOHLER et al. (2012) sind die englische Sorte Lynx und die deutsche Sorte Bussard mit hoher Wahrscheinlichkeit Träger eines solchen Allels. Im österreichischen Weizensortiment dürfte PMAA selten sein. Überständige Parzellen können mit zunehmend zeitlicher Distanz zum regulären Erntetermin hinsichtlich der Fallzahl fehlerhafte Informationen liefern. Im Verlauf mehrerer Wochen werden in den primär dormanten Genotypen keimhemmende Substanzen abgebaut. Unterschiede in der Fallzahl von trocken abgereiften Weizenbeständen geben kaum Hinweise zum Dormanzstatus und Sortenverhalten bei Auswuchswetter (REITAN 1990).

Zusammenfassung

Die vorzeitige Anreicherung von α -Amylase in Getreidekörnern aufgrund feuchter Witterung zur Reifezeit hat einen partiellen Stärkeabbau, niedrige Fallzahlen und Auswuchs zur Folge. Gravierende wirtschaftliche Einbußen sind damit verbunden. In den Jahren 2010 und 2011 wurden 124 Sorten und Zuchtlinien von Winterweizen aus Deutschland, Österreich und Großbritannien an drei österreichischen Standorten getestet. Folgende Merkmale wurden analysiert: Dormanz (Keimungsindex), Keimung intakter Ähren in der Feuchtkammer (1-9), sichtbarer Auswuchs am Feld (%) und Fallzahl (s). Die genannten Merkmale zeigten eine deutliche genotypische Variation. Die Heritabilität (h^2) lag mit 0,81 (Keimungsindex KIAL), 0,84 (Auswuchs in der Feuchtkammer), 0,91 (Auswuchsprozente im Freiland) und 0,86 (Fallzahl) durchwegs im hohen Bereich. Hingegen war die intervarietale Beziehung zweier Keimungsindizes zum sichtbaren Auswuchs unter Freilandbedingungen unbefriedigend ($r=0,44^{**}$ bzw. $0,51^{**}$). Auch der künstliche Auswuchs in der Feuchtkammer genügt als alleiniger Selektionsparameter bei der Züchtung auf Auswuchsresistenz nicht ($r=0,56^{**}$). Am zuverlässigsten sind Unterschiede in der Fallzahl, welche auf mehreren Standorten bei belastenden Witterungsbedingungen erzielt wurden. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) zwischen Fallzahl und sichtbarem Auswuchs im Freiland variierte bei polynomischer Kurvenanpassung für die Versuchsumwelten im Bereich von 0,74 bis 0,92.

Danksagung

Efficient phenotypic and molecular selection methods for enhancing preharvest sprouting tolerance of European wheat germplasm (Robust Wheat, CORNET Projekt 825860) wird von der FFG (www.ffg.at), der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs und der Börse für landwirtschaftliche Produkte finanziert. Herrn V. Mohler sei für die Berechnung der Heritabilität gedankt.

Literatur

- BARNARD A, VAN DEVENTER CS, MAARTENS H, 2005: Comparison between methods for estimating sprout damage in wheat. *S Afr J Plant Soil* 22: 44-48.
- BELDEROK B, 1976: Physiological-biochemical aspects of dormancy in wheat. *Cereal Res Commun* 4: 133-137.
- BFL, 2002: Methoden für Saatgut und Sorten. Richtlinien für die Sortenprüfung. Sorten- und Saatgutblatt. Schriftenreihe 59/2002. Bundesamt und Forschungszentrum für Landwirtschaft, Wien.
- DERERA NF, McMASTER GJ, BALAAM LN, 1976: Pre-harvest sprouting resistance and associated components in 12 wheat cultivars. *Cereal Res Commun* 4: 173-179.
- DIN, 2008: Getreide und Getreideerzeugnisse - Bestimmung von Besatz in Weizen (*Triticum aestivum* L.), Hartweizen (*Triticum durum* Desf.), Roggen (*Secale cereale* L.) und Futtergerste (*Hordeum vulgare* L.). Dt. Fassung, EN 15587, Deutsches Institut für Normung, Berlin.
- FINCH-SAVAGE WE, LEUBNER-METZGER G, 2006: Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol* 171: 501-523.
- GATFORD KT, HEARNDEN P, OGBONNAYA F, EASTWOOD RF, HALLORAN GM, 2002: Novel resistance to pre-harvest sprouting in Australian wheat from the wild relative *Triticum tauschii*. *Euphytica* 126: 67-76.
- GORDON IL, 1980: Germinability, dormancy and grain development. *Cereal Res Commun* 8: 115-129.
- HAGBERG S, 1960: A rapid method for determining alpha-amylase activity. *Cereal Chem* 37: 218-222.
- ICC, 2011: Bestimmung der "Fallzahl" nach Hagberg-Perten als Maß der α -Amylase-Aktivität im Getreide und Mehl. ICC-Standard Nr. 107/1. International Association of Cereal Science and Technology, Wien.
- ISTA, 2012: Internationale Vorschriften für die Prüfung von Saatgut, Ausgabe 2012. International Seed Testing Association, Bassersdorf.
- KING RW, RICHARDS RA, 1984: Water uptake in relation to pre-harvest sprouting in wheat: Ear characteristics. *Aust J Agric Res* 35: 327-336.
- KUMMER C, 2008: Qualität der österreichischen Brotgetreideernte 2008 - Auswirkungen auf die Verarbeitungseigenschaften der Mehle. *Mühle + Mischfutter* 145: 651-655.
- LUNN GD, KETTLEWELL PS, MAJOR BJ, SCOTT RK, 2001: Effects of pericarp α -amylase activity on wheat (*Triticum aestivum*) Hagberg falling number. *Ann Appl Biol* 138: 207-214.
- MARES DJ, 1983: Preservation of dormancy in freshly harvested wheat grain. *Aust J Agric Res* 34: 33-38.
- MARESD, MRVA K, 2008: Late-maturity α -amylase: Low falling number in wheat in the absence of preharvest sprouting. *J Cereal Sci* 47: 6-17.
- MOHLER V, SCHWEIZER G, HARTL L, 2012: Genetische Analyse des Merkmals Fallzahl in europäischen Winterweizen. Bericht 62. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 22-24 Nov 2011, pp. 69-71. BAL Raumberg-Gumpenstein, Irdning.
- MÜNZING K, 2011: Die Fallzahl von Weizen in der Rohstoffbewertung und Backwirksamkeit. *Mühle + Mischfutter* 148: 554.
- NORM EN 15587, 2008: Getreide und Getreideerzeugnisse - Bestimmung von Besatz in Weizen (*Triticum aestivum* L.), Hartweizen (*Triticum durum* Desf.), Roggen (*Secale cereale* L.) und Futtergerste (*Hordeum vulgare* L.). Deutsche Fassung.
- OBERFORSTER M, WERTEKER M, 2006: Auswuchsneigung und Fallzahl als Sorteneigenschaft von Winterweizen, Roggen, Triticale und Winterdurum. Bericht 56. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 22-24 Nov 2005, pp. 103-112. BAL Gumpenstein, Irdning.
- PATERSON AH, SORRELLS ME, OBENDORF RL, 1989: Methods of evaluation for preharvest sprouting resistance in wheat breeding programs. *Can J Plant Sci* 69: 681-689.
- PAULSEN GM, AULD AS, 2004: Preharvest sprouting of cereals. In: Benech-Arnold RL, Sanchez RA (Eds.), *Handbook of seed physiology: Applications to agriculture*, pp. 199-219. Food Product Press, New York.
- REITAN L, 1990: Relationship between seed dormancy and falling number in wheat. In: Ringlund K, Mosleth E, Mares DJ (Eds.), *Proc 5th Int Symp Pre-harvest sprouting in cereals*, pp. 233-240. Westview Press, Boulder.
- SCHÖGGL G, KUMMER C, 2005: Qualität der österreichischen Brotgetreideernte 2005 - Auswirkungen auf die Verarbeitungseigenschaften der Mehle. *Mühle + Mischfutter* 142: 646-649.
- TJIN WONG JOE AF, SUMMERS RW, LUNN GD, ATKINSON MD, KETTLEWELL PS, 2005: Pre-maturity α -amylase and incipient sprouting in UK winter wheat, with special reference to the variety Rialto. *Euphytica* 143: 265-269.
- TRETHOWAN RM, 2001: Preharvest sprouting tolerance. In: Reynolds MP, Ortiz-Monasterio JI, McNab A (Eds.) *Applications of physiology in wheat breeding*, pp. 145-147. CIMMYT, Mexico.
- WALKER-SIMMONS M, SESING J, 1987: Development of an immunoassay for abscisic acid in wheat grain utilizing a monoclonal antibody. In: Mares DJ (Ed.), *Proc 4th Int Symp Pre-harvest sprouting in cereals*, pp. 590-597. Westview Press, Boulder.
- WALKER-SIMMONS MK, 1988: Enhancement of ABA responsiveness in wheat embryos at higher temperature. *Plant Cell Env* 11: 769-777.
- WU J, CARVER B, 1999: Sprout damage and preharvest sprout resistance in hard white winter wheat. *Crop Sci* 39: 441-447.

Genetische Analyse des Merkmals Fallzahl in europäischen Winterweizen Genetic analysis of Hagberg falling number in European winter wheat

Volker Mohler^{1*}, Günther Schweizer¹ und Lorenz Hartl¹

Abstract

The Hagberg falling number, a value determining character of bread wheat, is a measure for starch strength. Low falling number is generally associated with pre-harvest sprouting which is defined as germination of mature seeds on the plant. However, additional causes of low falling number include late maturity α -amylase activity, prematurity sprouting or viviparity and retained pericarp α -amylase activity. The objective of this research was to identify quantitative trait loci (QTL) for falling number in the absence of pre-harvest sprouting using two bi-parental mapping populations. The genotypes were grown in four environments in Germany in 2008 and 2009. Considering means across environments, we found that the wheat-rye translocated chromosome T1BL·1RS, a QTL on chromosome 6B, and a QTL on chromosome 7BL - located in the same genomic region as the previously described major locus for late maturity α -amylase activity - had the strongest influence on falling number in the wheat germplasm investigated.

Keywords

Hagberg falling number, late maturity α -amylase activity, molecular markers, pre-harvest sprouting, *Triticum aestivum*

Einleitung

Die Fallzahl ist ein wertbestimmendes Merkmal für die Vermarktung von Weizen und beschreibt die Wirkung des Enzyms α -Amylase durch Prüfung des Grades der Stärkeverkleisterung einer wässrigen Weizenschrot-/Mehlsuspension. Klassischer Auswuchs, *Late-maturity* α -Amylase-Aktivität, Viviparie und *Retained pericarp* α -Amylase-Aktivität sind vier voneinander unabhängige Prozesse, die zu niedrigen Fallzahlen von Weizenmehl führen, wobei vorrangig die beiden erstgenannten zu wirtschaftlichen Einbußen führen (TJIN WONG JOE et al. 2005).

Late-maturity α -Amylase (LMA) ist ein genetischer Defekt, der in betroffenen Sorten zu einer frühzeitigen α -Amylase-Synthese während der späten Phase der Kornreifung führt (MARES und MRVA 2008). Die im reifen Korn andauernde α -Amylase-Aktivität bedingt dann niedrige Fallzahlen. Im Unterschied zum klassischen Auswuchs, also bei der Keimung physiologisch reifer Körner auf der Mutterpflanze, finden bei LMA keine Änderungen im Embryo statt,

weshalb diese beiden Prozesse unabhängig voneinander zu betrachten sind. Desweiteren handelt es sich um ein stark umweltabhängiges Merkmal. Die Ausprägung von LMA variiert nicht nur zwischen den Anbaujahren, den Standorten eines Anbaujahres und den Parzellen eines Standorts, sondern auch zwischen den Einzelpflanzen einer Parzelle, den Ähren einer Einzelpflanze sowie den Körnern einer Ähre. Dies betrifft vor allem anfällige Sorten, die durch einen besonderen genetischen Hintergrund gekennzeichnet sind. Anfällige Sorten mit den Giberellinsäure-insensitiven Verzweigungsallelen wie z.B. *Rht-D1b* zeigen eine temperaturabhängige Ausprägung. Für die Ausprägung von LMA wird ein Temperaturschock im Zeitfenster 25-30 Tage nach der Blüte benötigt, d.h. bei Fehlen des Temperaturschocks zeigen diese Genotypen stabile Fallzahlen (MARES und MRVA 2008). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Anwesenheit der Weizen-Roggen-Translokation T1BL·1RS den Effekt der Verzweigungsallele wieder umkehren kann (MARES und MRVA 2008).

Tabelle 1 zeigt die Fallzahlen ausgewählter Sorten aus dem Anbau in sieben Umwelten, die frei von Auswuchsbedingungen waren und rechtzeitig geerntet wurden. Während die Sorten Dream und Tommi sehr hohe Fallzahlen aufwiesen, waren die Sorten Bussard und Batis durch stabile Fallzahlen auf mittlerem bis hohem Niveau gekennzeichnet. Einzig die englische Sorte Lynx zeigte eine hohe Variabilität bezüglich der Ausprägung des Merkmals Fallzahl.

Material und Methoden

Die Kartierungspopulationen Dream/Lynx und Bussard/W332-84 wurden in jeweils vier Umwelten in zwei Wiederholungen in den Jahren 2008 und 2009 angebaut.

Tabelle 1: Fallzahlen ausgewählter Sorten aus dem Anbau in sieben Umwelten (Fallzahlen <220 s sind fett gedruckt)

Table 1: Falling numbers of selected cultivars grown in seven environments (falling numbers <220 s are printed in bold)

Umwelt	Sorte				
	Dream	Tommi	Bussard	Batis	Lynx
Morgenrot 2008	387	347	330	274	182
Aspachhof 2008	483	441	292	304	173
Mittelhof 2008	386	360	300	273	97
Jerxheim 2008	386	336	268	243	127
Morgenrot 2009	436	401	371	281	264
Sülbeck 2009	385	361	285	244	71
Jerxheim 2009	408	368	352	306	232

¹ Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 8, D-85350 FREISING

* Ansprechpartner: Volker MOHLER, volker.mohler@lfl.bayern.de

Die deutschen Sorten Dream und Bussard repräsentieren Qualitätsweizen, während die englische Sorte Lynx und der deutsche Zuchtstamm W332-84 der ertragreichen Brot- bzw. Futterweizenklasse zugeordnet werden können. Lynx ist zudem Träger des Verzweigungsallels *Rht-D1b* und der Weizen-Roggen-Translokation T1BL·1RS. Die Markerdicke der genetischen Karte der Population Dream/Lynx (SCHMOLKE et al. 2006) wurde mit Mikrosatelliten erhöht. Die Genotypisierung der Population Bussard/W332-84 erfolgte mit Diversity Arrays Technology (DArT)-Markern (AKBARI et al. 2006). Die Fallzahlen der Populationen wurden nach der Standard-Methode ICC-Nr. 107/1 (International Association for Cereal Science and Technology, Wien) aus Mischproben der Wiederholungen ermittelt. Die QTL-Analyse wurde mit der Software MultiQTL Version 2.6 (<http://www.multiqtl.com/>) durchgeführt. Hierbei gingen die Genotypdaten der Prüfumwelten als Mittelwert in das analytische Modell ein. Es wurde ein „Multiple Interval Mapping“ durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Bei Betrachtung der Genotyp-Mittelwerte über alle Umwelten konnten in der Population Dream/Lynx für das Merkmal Fallzahl drei Haupt-QTL auf den Chromosomen 1B, 6B und 7B lokalisiert werden, die 12,2%, 10,1% bzw. 19,1% der phänotypischen Varianz erklärten (Tabelle 2). Der QTL auf dem langen Arm von Chromosom 7B mit dem größten Effekt auf die Fallzahl (62 s) ist im gleichen Genomabschnitt lokalisiert wie ein QTL, der mit dem Merkmal α -Amylase-Synthese während der späten Kornreifungsphase assoziiert ist (MARES und MRVA 2008). Da die beiden Merkmale Fallzahl und α -Amylase-Synthese während der späten Kornreifungsphase eng miteinander zusammenhängen, könnte es sich um denselben funktionellen Genort auf Chromosom 7B handeln, der diesen beiden Merkmalen zugrundeliegt. Wie bereits für Backqualitätsmerkmale, z.B. Sedimentationswert, gezeigt (BURNETT et al. 1995), konnte auch für das Merkmal Fallzahl ein negativer Effekt der Weizen-Roggen-Translokation - Verringerung der Fallzahl im Mittel um 49 s - nachgewiesen werden. Der dritte Fallzahl-QTL auf Chromosom 6B kartiert in einer Region, die mit hoher Wahrscheinlichkeit mit dem Locus *Amy-B1*, der für α -Amylasen mit hohem isoelektrischen Punkt kodiert, assoziiert ist.

In der Population Bussard/W332-84 wurden zwei Haupt-QTL auf den Chromosomen 4A und 7B für das Merkmal Fallzahl identifiziert (Tabelle 2). Wie in der Population Dream/Lynx lokalisiert der QTL auf Chromosom 7B nicht nur in der gleichen genomischen Region, sondern ist auch mit einem Mittel von 59 s derjenige mit dem stärksten Effekt auf die Fallzahl.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass LMA im deutschen Winterweizensortiment vorhanden ist, jedoch nur in einem geringen Umfang. Die Sorten Lynx und Bussard tragen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit das für LMA ursächliche Allel auf Chromosom 7B. Während die Sorte Lynx sehr niedrige Fallzahlen aufwies, die durch das zusätzliche Vorhandensein der Weizen-Roggen-Translokation T1BL·1RS erklärt werden können, scheint der Eliteweizen Bussard diesen genetischen Defekt durch andere Genorte zu kompensieren, so dass kritische Schwellenwerte der Fallzahl i.d.R. nicht unterschritten werden.

Bei der Nutzbarmachung nicht adaptierter genetischer Ressourcen z.B. synthetischer Weizen (MRVA et al. 2009) treten immer wieder Linien mit LMA in Erscheinung, weshalb molekulare Selektionswerkzeuge entwickelt werden müssen, um diesen genetischen Defekt mittelfristig aus dem deutschen Züchtergenpool entfernen zu können.

Danksagung

Wir danken den folgenden Züchterhäusern für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung des Projekts: SW Seed Hadmersleben GmbH, Fr. Strube Saatzucht GmbH & Co. KG, Saatzucht Streng GmbH & Co. KG, Saatzucht Josef Breun GbR, Saatzucht Dieckmann GmbH & Co. KG und KWS Lochow GmbH.

Weiterhin gilt unser Dank allen beteiligten Mitarbeitern der Arbeitsgruppen IPZ 2c (Züchtungsforschung Weizen und Hafer), IPZ 1b (Genomanalyse) des Instituts für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung sowie der Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft.

Letztlich möchten wir uns bei der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GPZ, Projektnummer, G 116/07a) und dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMW, Projektnummer 16IN0577) für die Förderung des Projekts bedanken.

Tabelle 2: Signifikante ($P < 0.001$) QTL für das Merkmal Fallzahl in den Populationen Dream/Lynx and Bussard/W332-84

Table 2: Significant ($P < 0.001$) QTL for falling number in the populations Dream/Lynx and Bussard/W332-84

Chromosom	Markerintervall	Alle Umwelten			QTL-Donor ⁴
		LOD ¹	R ² (%) ²	Eff. (s) ³	
Dream/Lynx					
1B	<i>Xiag95 - Xgwm18</i>	5.1	12.2	49	Dream
6B	<i>XP7548-438 - XP7851-350</i>	4.9	10.1	45	Dream
7B	<i>XS2515-270 - XS2524-502</i>	8.8	19.1	62	Dream
Bussard/W332-84					
4A	<i>XwPt3349 - XwPt5434</i>	3.4	13.4	35	332-84
7B	<i>XwPt5069 - XwPt4902</i>	8.6	38.3	59	332-84

¹ LOD-Wert, *logarithm of odds-value*

² erklärter Anteil der phänotypischen Varianz

³ additive Alleleffekte der QTL in Sekunden

⁴ Donor des Allels, das zu einer höheren Merkmalsausprägung führt

Literatur

- AKBARI M, WENZL P, CAIG V, CARLING J, XIA L, YANG S, USZYNSKI G, MOHLER V, LEHMENSIEK A, KUCHEL H, HAYDEN MJ, HOWES N, SHARP P, VAUGHAN P, RATHMELL B, HUTTNER E, KILIAN A, 2006: Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theor Appl Genet* 113: 1409-1420.
- BURNETT CJ, LORENZ KJ, CARVER BF, 1995: Effects of the 1B/1R translocation in wheat on composition and properties of grain and flour. *Euphytica* 86: 159-166.
- MARES DJ, MRVAK, 2008: Late-maturity α -amylase: low falling number in wheat in the absence of preharvest sprouting. *J Cereal Sci* 47: 6-17.
- MRVA K, CHEONG J, YU B, LAW HY, MARES DJ, 2009: Late maturity α -amylase in synthetic hexaploid wheat. *Euphytica* 168: 403-411.
- SCHMOLKE M, ZIMMERMANN G, BUERSTMAYR H, SCHWEIZER G, MIEDANER T, KORZUN V, EBMEYER E, HARTL L, 2005: Molecular mapping of Fusarium head blight resistance in the winter wheat population Dream/Lynx. *Theor Appl Genet* 111: 747-756.
- TJIN WONG JOE AF, SUMMERS RW, LUNN GD, ATKINSON MD, KETTLEWELL PS, 2005: Pre-maturity α -amylase and incipient sprouting in UK winter wheat, with special reference to the variety Rialto. *Euphytica* 143: 265-269.

Warum sind Steinbrand und Zwergsteinbrand derzeit nicht nur im ökologischen Getreidebau ein Problem?

Why cause common bunt and dwarf bunt of wheat not only problems in organic farming?

Benno Voit¹*, Markus Dressler und Berta Killermann

Abstract

Dwarf and common bunt occurrence on organic wheat fields increase the spore potential in the soil - this could have been measured the first time ever. The spore potential in the soil is a latent hazard for the infestation of further wheat crops. Years without bunt infestation do not exist: slight and scarcely observable infestation always occurs in further wheat crops, whereas, high infestation rates only occur under certain weather conditions. A considerable decrease of infestation risk on organic fields should be reached by breeding and cultivation of tolerant and/or resistant varieties. In conventional farming protection against dwarf bunt of wheat decreased significantly after banning mercurial seed dressings. Currently only Landor CT[®] has lasting effects against this fungus. Since so far only 50% of wheat seeds have been treated with this chemical the spore potential in the soil has significantly increased in recent years, as the high infestation rate in 2011 has shown. Even by using Landor CT[®] you have to take care upon the prescribed application rate and consistent treatment. Problems with common bunt of wheat are less important in conventional farming because all chemical seed treatments act against common bunt. Moreover, only a few conventional farmers refrain from using chemical seed treatment completely.

Keywords

Chemical seed treatment, organic farming, seedborne disease, soilborne disease, spore potential, *Tilletia caries*, *Tilletia controversa*, *Triticum aestivum*

Einleitung

Eigentlich glaubte man, dass Brandkrankheiten ausgestorben seien. Doch die vergangenen Jahre haben uns eines Besseren belehrt. So sind derzeit Zwergsteinbrand (*Tilletia controversa*) und Steinbrand (*Tilletia caries*) die gefürchtetsten Krankheiten im ökologischen Weizenanbau. Wenn Befall vorliegt, ist die Ware häufig unbrauchbar und damit mit hohen finanziellen Verlusten verbunden. Auch im konventionellen Landbau war der Befall mit Zwergsteinbrand noch nie so hoch wie 2011. Zur Beantwortung der Frage warum das so ist, kann zum Großteil auf die Ergebnisse des

Forschungsprojektes „Erarbeitung von Schwellenwerten zur wirksamen Bekämpfung von Zwergsteinbrand und Steinbrand sowie deren praktische Umsetzung im Öko-Landbau“, zurückgegriffen werden (DRESSLER et al. 2011).

Methodik und Ergebnisse

Zwergsteinbrand

Die Versuche wurden in Bayern, Baden-Württemberg und Österreich auf Öko-Praxisflächen durchgeführt, die bereits ein Brandsporenpotenzial im Boden aufgewiesen haben. Die mehrfaktorielle Anlage der Feldversuche erfolgte als randomisierte Streifenanlage, mit einer Parzellengröße von 10-13 m². Angebaut wurde jeweils eine anfällige Winterweizen- und Dinkelsorte sowie eine weniger anfällige Sorte mit unterschiedlichen Saatgutinfektionen (Kontrolle, 20 und 100 Sporen/Korn) und vier Wiederholungen. Da die Zwergsteinbrandinfektion nahezu ausschließlich über das Sporenpotenzial des Bodens erfolgt, wurde zusätzlich eine Variante mit künstlicher Bodeninfektion (0,5 g Sporen/m³) angelegt.

Nach dem Ährenschieben wurde jede Parzelle auf befallene Ähren bonitiert. An der geernteten Ware erfolgte die Bestimmung der Brandsporen entsprechend der ISTA Methode (Working Sheet No 53, Handbook on Seed Health Testing). Da es für die Bestimmung des Sporenpotenzials im Boden keine Untersuchungsmethode gab, musste dafür erst ein Untersuchungsverfahren entwickelt werden. Als geeignet erwies sich das Auswaschen der Sporen aus dem Boden mittels Nassfiltration und anschließender Bestimmung nach ISTA unter dem Lichtmikroskop.

Die Hauptinfektion bei Zwergsteinbrand findet über den Boden während der Bestockung statt, d.h. im Zeitraum November bis März. Die optimale Keimtemperatur für die Brandsporen liegt bei 0-5°C. Diese Idealbedingungen herrschten im Herbst 2008 auf dem Standort in Baden-Württemberg vor. Im November fiel Schnee auf nicht gefrorenen Boden und der Schnee blieb bis März liegen. Zusammen mit dem Licht unter der Schneedecke waren die Bedingungen für die Keimung der Brandsporen und den Befall der jungen Weizenpflanzen optimal. Mit über 11500 Sporen/Korn am Erntegut war dies der höchste Befall in den drei Jahren an einem Standort (*Tabelle 1*).

¹ Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, AG Saatgutuntersuchung/Saatgutforschung, Lange Point 6, D-85354 FREISING
* Ansprechpartner: Benno VOIT, benno.voit@lfl.bayern.de

Tabelle 1: Besatz mit Zwergsteinbrand am Erntegut auf dem Standort Baden-Württemberg, sowie das Sporenpotenzial im Boden nach der Saat und nach der Ernte (2009)

Behandlung	Sporen pro Korn am Erntegut	Sporen in 10 g Boden nach der Saat	Sporen in 10 g Boden nach der Ernte
Kontrolle	8300	152	7112
Bodeninfektion	11571	80	29376
20 Sporen/Korn	2391	87	7676
100 Sporen/Korn	1966	29	4374

Erwartungsgemäß hatte die Variante Bodeninfektion den höchsten Befall. Dies konnte auch auf den anderen Standorten und in den anderen Versuchsjahren beobachtet werden. Zwischen den beiden Saatgutinfektionsstufen 20 und 100 Sporen/Korn zeigte sich in keinem Jahr und auf keinem Standort ein signifikanter Befallsunterschied am Erntegut.

In den anderen Jahren und Versuchsstandorten waren keine Befallsbedingungen gegeben. Entweder war der Boden gefroren oder es war ein schneeloser Winter wie 2007. Trotzdem trat in jedem Jahr und auf jedem Standort ein leichter Befall auf, der jedoch schwer wahrzunehmen ist. Das heißt es gibt keine befallsfreien Jahre. Der Befall am Erntegut war gering, so dass die Verwertung der Ware nicht beeinträchtigt wurde (Tabelle 2).

Tabelle 2: Durchschnittlicher Besatz mit Zwergsteinbrand am Erntegut auf dem Standort Bayern, sowie das Sporenpotenzial im Boden nach der Saat und nach der Ernte (2008-2010)

Behandlung	Sporen pro Korn am Erntegut	Sporen in 10 g Boden nach der Saat	Sporen in 10 g Boden nach der Ernte
Kontrolle	61	93	128
Bodeninfektion	2837	608	2678
20 Sporen/Korn	87	79	526
100 Sporen/Korn	260	89	257

Umso überraschender war daher die deutliche Zunahme des Brandsporenpotenzials im Boden. Damit wurde klar, dass beim Mähdrusch mehr Brandsporen wieder auf das Feld gelangten, als im Erntegut festgestellt wurden. Lag vor der Aussaat das Sporenpotenzial im Boden bei unter 100 Sporen in 10 g Boden, so war das Potenzial nach der Ernte selbst bei einem geringen Befall jeweils deutlich über 100 Sporen in 10 g Boden. In einem Jahr mit starkem Befall, wie 2009 in Baden-Württemberg, hat das Sporenpotenzial im Boden von ca. 100 Sporen auf über 29000 Sporen in 10 g Boden zugenommen. Dieses enorme Infektionspotenzial im Boden, das bei Zwergsteinbrand 10 Jahre und länger infektiös bleibt, wird von der Praxis nicht wahrgenommen und für den nachfolgenden Weizenanbau im Rahmen der Fruchtfolge völlig außer Acht gelassen. Die schnelle bzw. langsame Zunahme des Sporenpotenzials im Boden muss, je nach Befallsituation, dringend unterbunden werden. Dazu ist es notwendig, dass nur geprüftes Saatgut ausgesät wird, um das Sporenpotenzial im Boden gering zu halten. Darauf muss in Zukunft in der Praxis mehr geachtet werden.

In den Versuchen haben sich zwischen der anfälligen Sorte und der weniger anfälligen Sorte keine signifikanten Unterschiede in der Befallshöhe am Erntegut gezeigt. Auch zwischen Weizen und Dinkel zeigten sich keine signifikanten

Unterschiede in der Anfälligkeit. Da im Projekt nur zwei Sorten bearbeitet werden konnten und die Beschreibende Sortenliste des Bundessortenamtes keine Auskunft über die Brandanfälligkeit der Sorten gibt, wurde im letzten Jahr ein Sortenanfälligkeitsversuch durchgeführt (BSA 2011). Von den 21 Sorten, die auf zwei Standorten zum Anbau kamen, war keine Sorte völlig befallsfrei. Es zeigten sich aber sehr deutliche Unterschiede in der Anfälligkeit der Sorten. Falls sich die Ergebnisse im nächsten Jahr bestätigen, besteht mit der entsprechenden Sortenwahl ein gutes Regulativ den Befall am Erntegut und das Sporenpotenzial im Boden gering zu halten.

Noch mehr überrascht als die Biobetriebe sind die konventionellen Betriebe bei einem Befall mit Zwergsteinbrand, da diese Betriebe chemische Beizmittel verwenden dürfen. Doch genau darin liegt das Problem. Bis 1980 war die Beizung mit quecksilberhaltigen Mitteln Standard. Die Wirkung dieser Beizmittel gegen Zwergsteinbrand war hervorragend. Seit mittlerweile mehr als 30 Jahren sind die Quecksilberbeizmittel verboten. Die quecksilberfreien Beizmittel sind in der Wirkung mit den quecksilberhaltigen Mitteln nicht vergleichbar. Derzeit hat nur das Beizmittel Landor CT® eine Wirkung gegen Zwergsteinbrand. Damit erklärt sich, warum der Befall nicht nur in Biobetrieben, sondern auch in konventionellen Betrieben mit chemischer Beizung auftritt (KILLERMANN und VOIT 2011a). In Bayern wurden bisher ca. 50% des Weizensaatgutes mit Landor CT® gebeizt. Die restlichen 50% des ausgesäten Weizensaatgutes verfügten über keinen Schutz gegen Befall mit Zwergsteinbrand. Von daher ist es nachvollziehbar, dass sich in den vergangenen 30 Jahren ein Infektionspotenzial im Boden aufgebaut hat. Hinzu kommt, dass es keine befallsfreien Jahre gibt, wie die Versuchsergebnisse gezeigt haben. Das Auftreten von Zwergsteinbrand war früher eher regional begrenzt und konzentrierte sich auf Bayern, Baden-Württemberg, Schweiz und Österreich. In diesem Jahr wurde auch in Thüringen, Sachsen, Sachsen-Anhalt sowie Hessen Befall festgestellt. Dazu passt die Beobachtung, dass Zwergsteinbrand heute bereits in 400 m NN auftritt, während früher Zwergsteinbrand nur in Höhenlagen über 1000 m NN zu finden war. Mit dem früher nur regionalen Auftreten von Zwergsteinbrand lohnte es sich für die Beizmittelhersteller nicht, Präparate zu entwickeln, die auch eine Zwergsteinbrandwirkung haben. Zukünftig wird sich das vermutlich ändern.

Sehr oft wurde die Frage gestellt, warum 2011 ein so starkes Befallsjahr war? Der Grund dafür ist eine ganz seltene Witterungskonstellation. Ende November 2010 ging der Regen nahtlos in Schnee über. Die Schneedecke wuchs täglich und blieb bis kurz vor Weihnachten liegen. Unter der Schneedecke auf dem offenen, nicht gefrorenen Boden entstanden ideale Keim- und Lichtverhältnisse für die Brandsporen im Boden und den Befall des Weizens (KILLERMANN und VOIT 2011b). Wäre vor dem Schneefall der Boden gefroren gewesen oder die Schneedecke nur ein paar Tage liegen geblieben, wie es meist der Fall ist, hätte dies nur zu einem geringen Befall geführt.

Wenn die Infektion gesetzt ist, wächst sie mit der Pflanze hoch. Der Befall ist zunächst nicht sichtbar. In der Literatur spricht man zwar von Blattaufhellungen, in der Praxis ist es aber schwierig den Befall im 3-8 Blattstadium zu erkennen.

Eindeutig ist die Bestimmung ab dem Ährenschieben. Von Zwergsteinbrand befallene Pflanzen bleiben kürzer und die Ährchen sind vor der Reife gespreizt. In den Ähren bilden sich anstelle der Körner Brandbutten.

Biobetriebe mit Zwergsteinbrandbefall, stellen häufig die Frage wie lange mit dem Weizenanbau ausgesetzt werden soll bzw. wie lange die Brandsporen im Boden infektiös bleiben. Eine genaue Angabe von Jahren ist derzeit nicht möglich. In der Literatur werden 10 und mehr Jahre für die Infektionsfähigkeit der Brandsporen genannt. Nach unseren Beobachtungen in Befallsbetrieben hat sich das auch bestätigt. Ob die Lebensfähigkeit der Brandsporen durch die Bewirtschaftung beeinflusst werden kann, wird derzeit in einem weiteren Forschungsprojekt erarbeitet. Einfacher ist die Situation bei den konventionellen Betrieben. Durch eine Beizung mit Landor CT® lässt sich der Befall vermeiden. Allerdings ist wichtig, dass die Aufwandmenge eingehalten und das Beizmittel gleichmäßig auf alle Körner verteilt wird. Ein Nichteinhalten dieser Vorgaben führt zu einer Wirkungsminderung und damit zu einem Befall.

Steinbrand

Der (Gewöhnliche) Steinbrand ist ebenfalls eine Brandkrankheit bei Weizen. Genau wie bei Zwergsteinbrand bilden sich in den Ähren anstatt der Körner die Brandbutten. Bei starkem Befall ist die Ware schwarz, riecht nach Heringslake und ist damit unbrauchbar (KILLERMANN und VOIT 2011c). Beide Krankheiten werden sowohl in der Praxis als auch in der Beratung immer wieder miteinander verwechselt. Dabei sieht das Befallsbild im Feldbestand bei Steinbrand anders aus. Die befallenen Pflanzen haben nahezu die gleiche Länge als die gesunden Pflanzen und sind daher mit Zwergsteinbrand nicht zu verwechseln. Im Unterschied zu Zwergsteinbrand erfolgt die Infektion bereits während der Keimung des Weizens. Wie beim Zwergsteinbrand wurden auch beim Steinbrand mehrjährige und mehrortige Feldversuche durchgeführt. Dabei zeigte sich ganz deutlich, dass auch beim Steinbrand eine Infektion vom Boden aus erfolgen kann (Tabelle 3).

So wurde auf dem Standort in Bayern 2008 in der Kontrollparzelle ein Befall mit 13739 Sporen/Korn festgestellt. Im Vergleich dazu war der Befall am Standort Sachsen mit 314 Sporen/Korn deutlich niedriger. Günstige Befallsbedingungen liegen vor, wenn nach der Saat der Boden über einen längeren Zeitraum trocken bleibt und die Keimung sehr langsam vorangeht. Diese Witterung traf auf dem bayerischen Versuchsstandort zu. Nach der Saat fiel mehr als 2 Wochen kein Regen, dies führte zu einem hohen Befall der zwischen 13739 und 21442 Sporen/Korn lag. Über alle Versuchsorte und -jahre zeigte sich, dass der Befall umso

höher war, je stärker das ausgesäte Saatgut bereits mit Brandsporen befallen war. Dies unterstreicht, wie wichtig die Kenntnis der Befallshöhe des ausgesäten Saatgutes ist. Auf dem Standort in Sachsen waren die Auflaufbedingungen günstig. Bereits 5 Tage nach der Saat fiel Regen und der Weizen lief zügig auf. Der Weizen wuchs dem Pilz davon, deshalb lag der Befall nur zwischen 299 und 526 Sporen/Korn, obwohl im Boden ein Sporenpotenzial von über 1000 Sporen in 10 g Boden vorlag. Wie bei Zwergsteinbrand wurde auch bei Steinbrand das Sporenpotenzial im Boden nach der Ernte untersucht. Auch hier zeigt sich je nach Befallshöhe im Erntegut eine entsprechende Zunahme des Sporenpotenzials im Boden nach der Ernte. Auf dem Standort Bayern lag zum Saatzeitpunkt des Weizens das Sporenpotenzial bei unter 100 Sporen in 10 g Boden (Tabelle 3). Nach der Ernte wurden deutlich mehr als 100 Sporen in 10 g Boden festgestellt. Auf dem Standort in Sachsen nahm das Sporenpotenzial nach der Ernte sogar ab.

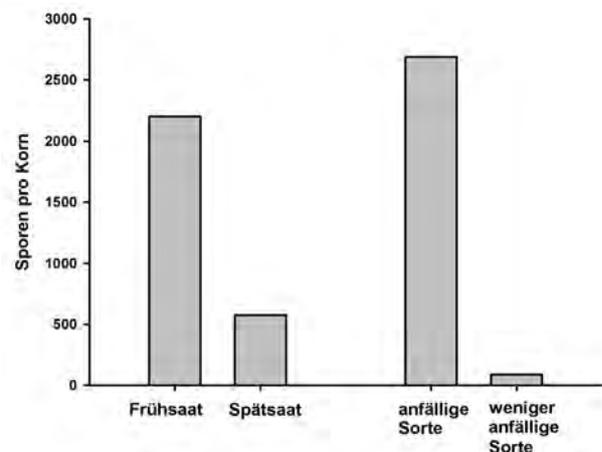


Abbildung 1: Durchschnittlicher Besatz mit Steinbrand am Erntegut von allen Standorten bei Früh- und Spätsaat bzw. bei anfälliger und weniger anfällige Sorte

Die Gründe dafür sind, dass zum einem der Befall auf dem Standort deutlich geringer war und zum anderen das hohe Ausgangssporenpotenzial im Boden aus dem Jahr 2006 herrührte. Es zeigt sich, dass nach 2 Jahren bereits ein Teil der Brandsporen nicht mehr nachweisbar ist. Dieses Ergebnis stimmt gut überein mit den Angaben in der Literatur, in der von einer Infektionsfähigkeit der Brandsporen von 3 bis 6 Jahren berichtet wird. Nachdem bei Steinbrand die Infektion bereits bei der Keimung erfolgt, stellt sich die Frage, ob der Saatzeitpunkt einen Einfluss auf den Befall hat. Die Ergebnisse aus den Feldversuchen zeigen, dass das Erntegut aus der Frühsaat Anfang Oktober mit durchschnittlich 2201 Sporen/Korn einen viermal so hohen Befall aufwies, als

Tabelle 3: Durchschnittlicher Besatz mit Steinbrand am Erntegut auf den Standorten Bayern und Sachsen sowie das Sporenpotenzial im Boden nach der Saat und der Ernte (2007/08)

Behandlung	Sporen pro Korn am Erntegut		Sporen in 10 g Boden			
	Bayern	Sachsen	nach der Saat		nach der Ernte	
			Bayern	Sachsen	Bayern	Sachsen
Kontrolle	13739	314	22	1281	209	841
20 g Sporen pro Korn	14760	526	72	1209	188	1044
100 g Sporen pro Korn	21442	299	51	1807	127	461

die Ernteware der Spätsaat Ende Oktober (*Abbildung 1*). Einen noch stärkeren Einfluss auf das Befallsgeschehen als die Saatzeit hat die angebaute Sorte. In den Feldversuchen kam jeweils eine anfällige und weniger anfällige Sorte zum Anbau. Im Durchschnitt der Versuchsjahre und -orte hatte die anfällige Sorte einen Befall von 2690 Sporen/Korn. Demgegenüber wies die weniger anfällige Sorte einen Befall von nur 87 Sporen/Korn auf.

Mit der entsprechenden Sortenwahl verfügt der Landwirt über ein sehr gutes Instrument den Befall niedrig zu halten. Da die Beschreibende Sortenliste keine Auskunft über die Steinbrandanfälligkeit der Sorten gibt und in den Feldversuchen nur 2 Sorten getestet werden konnten, wurde auch hier mit Sortenanfälligkeitsversuchen begonnen. Erste Ergebnisse liegen vor und zeigen sehr unterschiedliche Anfälligkeiten. Die Sorte mit dem höchsten Befall wies 10800 Sporen/Korn auf. Sorten völlig ohne Befall konnten nicht beobachtet werden, der Befall der weniger anfälligen Sorten lag aber unter 50 Sporen/Korn. Interessant dabei ist, dass es sich fast durchwegs um neuere Sorten aus ökologischer Züchtung handelt. Da in den Sortenversuchen das 3. Jahr noch fehlt, werden die Sortennamen noch nicht veröffentlicht.

Steinbrand bereitet den konventionellen Betrieben nur wenig Probleme, da alle Beizmittel eine Steinbrandwirkung haben. Probleme treten auf, wenn Beizmittelaufwandmengen reduziert werden oder die Beizmittelverteilung auf den Körnern sehr ungleichmäßig und ein Teil der Körner völlig ungebeizt ist. Auch für die ökologisch wirtschaftenden Betriebe besteht die Möglichkeit der Saatgutbehandlung bei Steinbrandbefall. Allerdings ist der Wirkungsgrad nicht vergleichbar mit den chemischen Beizmitteln. In ungünstigen Jahren liegt der Wirkungsgrad bei nur ca. 65%. Dies ist u.a. auch der Grund dafür, dass der Befall am zu behandelnden Saatgut nicht über 100 Sporen/Korn liegen soll. Der Befall lässt sich damit nicht ganz vermeiden, aber zumindest reduzieren.

Zusammenfassung

Ökologische Betriebe

Wenn in einem Betrieb Zwergsteinbrand oder Steinbrand aufgetreten ist, führt das zu einer Zunahme des Sporenpotenzial im Boden, wie erstmals nachgewiesen werden

konnte. Das Sporenpotenzial im Boden stellt ein latentes Befallsrisiko für den weiteren Weizenanbau dar, das aber in der Praxis völlig außer Acht gelassen wird. Befallsfreie Jahre gibt es bei Brandkrankheiten nicht, d. h. leichter, kaum wahrnehmbarer Befall tritt bei jedem Weizenanbau auf. Hoher Befall tritt dagegen nur bei passenden Witterungsbedingungen auf. Die Fortschritte in der Weizenzüchtung lassen hoffen, dass mit toleranten oder resistenten Sorten der Befall mit Brandkrankheiten deutlich abnimmt.

Konventionelle Betriebe

Mit dem Verbot der quecksilberhaltigen Beizmittel ist der Schutz gegen Zwergsteinbrand deutlich schwächer geworden, da derzeit nur ein Beizmittel (Landor CT®) gegen Zwergsteinbrand wirkt. Bisher wurden nur ca. 50% des Saatweizens mit Landor CT® gebeizt, deshalb hat sich in den vergangenen Jahren in vielen Böden ein Infektionspotenzial aufgebaut. Bei passender Witterung führt das zu einem hohen Befall wie es das Jahr 2011 gezeigt hat. Selbst bei der Beizung mit Landor CT® ist unbedingt auf die vorgeschriebene Aufwandmenge und gleichmäßige Beizung aller Körner zu achten, da sonst Wirkungsverluste auftreten und in Folge davon wiederum Befall auftritt. Beim Steinbrand ist das Problem deutlich geringer, da alle Beizmittel eine Steinbrandwirkung haben und es nur wenige Betriebe gibt, die auf eine Beizung völlig verzichten.

Literatur

- DRESSLER M, VOIT B, BÜTTNER P, KILLERMANN B, 2011: Mehrjährige Ergebnisse zur Strategie gegen Zwergsteinbrand (*Tilletia controversa*) und Steinbrand (*Tilletia caries*) im Ökologischen Getreidebau. VDLUFA Schriftenreihe 67, in Druck.
- BSA, 2011: Beschreibende Sortenliste. Getreide, Mais, Öl- und Faserpflanzen, Leguminosen, Rüben, Zwischenfrüchte. Bundessortenamt, Hannover.
- KILLERMANN B, VOIT B, 2011a: Stinkende Weizenkörner - Schon vergessene Krankheiten kommen zurück. Bayerisches Landwirtschaftliches Wochenblatt, Heft 33, 36-37.
- KILLERMANN B, VOIT B, 2011b: Zwei fast überwundene Krankheiten kehren zurück. Newsletter des Gemeinschaftsfonds Saatgetreide 04/2011.
- KILLERMANN B, VOIT B, 2011c: Die schwarze Gefahr - Zwergsteinbrand und Steinbrand kehren zurück. Landwirtschaftliches Wochenblatt Baden-Württemberg, 178. Jhg., Heft 34, 12-13.

Erkennung technologischer und allergener Eigenschaften an Hand von Proteinspektren in Getreide

Recognition of technological and allergenic properties in spectra of cereal proteins

Atousa Motie^{1*} und Manfred Werteker¹

Abstract

Gliadins and glutenins of 162 wheat flour samples from VCU trials of the harvest 2008 and 144 from 2009 were investigated by HPLC. 54 protein fractions were analysed quantitatively and related to loaf volume, dough stability, extensogram data, Zeleny sedimentation value, swelling and falling number. Using 161 barley samples the method was extended to the calculation of technological parameters of malt. In barley albumins, globulins, hordeins and hordenins - at all 98 peaks - were brought into correlation with extract yield, extract difference, diastatic power, soluble nitrogen and Kolbach number. The method of multivariate data analysis and principal-component-regression was applied for the creation of mathematical models for the prediction of the above mentioned technological parameters from protein spectra. The method was shown to be suitable for the prediction of selected technological parameters. Positive and negative influences of protein fractions on technological parameters were estimated by B coefficients. For the sedimentation value, dough energy, and loaf volume good correlations in the range of $R^2=0.7$ to 0.8 were obtained between calculated and analysed results. The identification of T-cell stimulating epitops from $\alpha 20$ -gliadine in HPLC-fractions of proteins by ELISA could be performed successfully in this project.

Keywords

Allergenic properties, cereals, *Hordeum vulgare*, HPLC, storage proteins, technological quality, *Triticum aestivum*

Einleitung

Ziel der Untersuchungen war die Entwicklung von auf den Ergebnissen von HPLC-Trennungen von Speicherproteinen beruhenden Methoden zur Analyse der technologischen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Getreide.

Der technologische Teil der Studie sollte vor allem dem Ziel einer Hilfestellung für den Züchtungsfortgang durch molekulare Marker dienen, wie dies bereits in zahlreichen Studien angedacht wurde (PENA et al. 2002). Bisher durchgeführte Studien über die Zusammenhänge zwischen Proteinspektren und Qualitätsparametern beruhten vor allem auf

elektrophoretischen Untersuchungen (BALDSHIEV et al. 1997, SAPIERSTEIN et al. 1998, MIR et al. 1999, AMMAR et al. 2000). Die elektrophoretischen Muster werden dabei nur qualitativ ausgewertet. Quantitative Untersuchungen über die vorhandene Menge einer Proteinfraction bzw. über das Verhältnis verschiedener Proteinkomponenten zueinander wurden bisher in weit geringerem Maße publiziert und beruhen meist auf der Anwendung chromatographischer Methoden (BURNOUF und BIETZ 1984). Der Beitrag einer quantitativen Auswertung zur Vorhersage von Qualitätseigenschaften und zur Aufklärung von Einflüssen bestimmter Proteine auf das technologische Verhalten von Getreide ist dem gemäß weit weniger erforscht. Neben der Zuverlässigkeit der Methode zur Vorhersage unterschiedlicher technologischer Qualitätskriterien waren vor allem Zusammenhänge zwischen dem Auftreten verschiedener Peaks in den Chromatogrammen und der verstärkten oder verminderten Ausprägung technologischer Merkmale zu finden und zu prüfen. Besonderes Interesse verdienen in diesem Zusammenhang immer wieder berichtete Widersprüche zwischen den Ergebnissen indirekter Qualitätsmerkmale und den Resultaten von Backversuchen (ROGERS et al. 2001).

Während die technologischen Untersuchungen, abgesehen von den angewandten statistischen Verfahren, auf wohl bekannten und im eigenen Labor erprobten und akkreditierten Methoden beruhten, wurde im Bereich der Untersuchung auf Glutenunverträglichkeit wissenschaftliches und experimentelles Neuland betreten. Zunächst zeigte sich, dass Test-Kits zur Identifizierung pathogener Epitope nicht verfügbar waren (SPAENIJ-DEKKING 2004, MITEA et al. 2008).

Die bis vor kurzem ausschließlich erhältlichen ELISA-Test-Kits beruhen auf monoklonalen Antikörpern gegen die Epitope QQQFP, QQQFP, LQPFP und QLPPF (SKERITT und HILL 1990). Wie Vergleiche mit einer Auswahl an hinsichtlich ihrer Pathogenität untersuchten Peptiden aus Gliadinfraktionen (WIESER und KÖHLER 2008) zeigten, sind die angeführten Epitope sowohl in pathogenen als auch in nicht pathogenen Peptiden in gleichem Maße vorhanden. Durch Anwendung eines gegen ein T-Zellen stimulierendes Peptid aus $\alpha 20$ -Gliadin spezifischen ELISA konnte eines der potentiell pathogenen Epitope mit der Aminosäuresequenz FRPQQPYP im Getreideproteom nachgewiesen und einzelnen Proteinfractionen zugeordnet werden.

¹ Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

* Ansprechpartner: Manfred WERTEKER, manfred.werteker@ages.at

Material und Methoden

Zur Untersuchung gelangten sämtliche im Rahmen der amtlichen Sortenwertprüfung zu Mahl- und Backversuchen herangezogene Weizenproben der Ernten 2008 und 2009. Insgesamt wurden aus der Ernte 2008 162 und aus der Ernte 2009 144 Weizenproben untersucht. Die Untersuchungen bezüglich der Brau- und Mälzungsseignung der Gersten beruhten auf einer Auswertung von 161 Kleinmälzungsversuchen der Ernte 2009.

Die Proteinanalysen wurden nach WIESER et al. (1998) durchgeführt und umfassten die Auftrennung der Proteine mittels modifizierter Osborne-Fraktionierung in Albumine+Globuline, Gliadine und Glutenine und anschließende Untersuchung dieser Fraktionen durch RP-HPLC. Insgesamt wurden 54 Peaks der Proteintrennungen von Weizenproben und 98 Peaks aus den Gerstenchromatogrammen in die Untersuchungen mit einbezogen.

Die technologischen Eigenschaften wurden nach den entsprechenden ICC-Standards (International Association for Cereal Science and Technology, Wien) ermittelt. Die Mahl- und Backversuche wurden nach den Vorschriften des Institutes für Sortenwesen der AGES durchgeführt.

Rechenmodelle wurden auf der Basis der multivariaten Datenanalyse und der Principal Component Regression mit dem Programm Unscrambler, Vers. 9.6 (Camo Software AS, Oslo) erstellt. Technologisch wichtige Fraktionen wurden an Hand der B-Koeffizienten selektiert. Der Einfluss einer Proteinfraktion, d.h. eines Peaks wurde dann als signifikant eingestuft, wenn der zugehörige B-Koeffizient in allen drei aus Teilmengen erstellten Rechenmodellen das gleiche Vorzeichen hatte. Bei Weizen war überdies erforderlich, dass in beiden Versuchsjahren das gleiche Vorzeichen zu beobachten war.

Die vorhandenen Chromatogrammdaten und Referenzwerte wurden nicht nur zur Erstellung von Kalibrationen verwendet. Das verwendete Programm sieht auch Algorithmen zur Validierung vor. In diesem Falle wurden nicht alle vorhandenen Daten, sondern nur 4/5 zur Berechnung der Kalibration herangezogen. Ein weiteres Fünftel wurde mit der so erstellten Kalibration berechnet und die Korrelation zwischen errechneten und analysierten Daten berechnet. Dieser Prozess wird fünfmal wiederholt, wobei jedes Mal ein anderes Fünftel aus dem Kalibrationsdatensatz ausgeschlossen wird.

Pathogene Epitope wurden im Eluat der HPLC-Trennungen mit Hilfe des pathogenespezifischen ELISA nachgewiesen.

Ergebnisse

Die Rechenmodelle zeigten, dass von den teigrheologischen Parametern die Teigenergie am besten vorhersagbar war. Bereits durch die erste Hauptkomponente konnten etwa 60% der Variabilität erklärt werden. Zwischen Kalibrierung und Validierung ergaben sich dabei nur geringe Differenzen und zwischen berechneten und analysierten Werten wurde bei Anwendung des zur Validierung vorgesehenen Rechenchemas eine Korrelation von $R^2=0,73$ erreicht. Auch für die Dehnlänge konnten zuverlässige Rechenmodelle erstellt werden. Die erste Hauptkomponente konnte etwa 50% der

Variabilität der Dehnlänge erklären. Die Korrelation zwischen berechneten und analysierten Werten betrug $R^2=0,69$.

Deutlich schwächer war hingegen das Modell für den Dehnwiderstand. Hier konnte die erste Hauptkomponente im Validierungsmodus nur knapp mehr als 10% der Variabilität erklären. Mit etwa 8 Hauptkomponenten konnten schließlich etwa 50% erklärt werden. Die zugehörige Korrelation zwischen berechneten und gefundenen Werten lag bei $R^2=0,55$. Die Differenz zwischen der durch Kalibration und der durch Validierung erklärten Variabilität war erheblich höher als bei den Modellen für Teigenergie und Dehnlänge.

Beim Gebäckvolumen konnten mit der ersten Hauptkomponente bei geringem Unterschied zwischen Kalibrierung und Validierung etwa 35% der Variabilität erklärt werden. Zur Erreichung von ca. 45% erklärter Variabilität waren jedoch 10 Hauptkomponenten erforderlich, wobei auch die Differenz zwischen Kalibrierung und Validierung erheblich zunahm.

Die Ergebnisse, insbesondere die erhöhten Differenzen der erklärten Variabilität zwischen Kalibrierung und Validierung zeigen, dass Parameter wie Dehnwiderstand und Gebäckvolumen offenbar auch durch Ursachen beeinflusst werden, die nicht unmittelbar mit dem Proteinspektrum in Zusammenhang stehen. Trotzdem konnte das Gebäckvolumen von Proben, die bei der AGES verbacken wurden, die aber nicht Teil der Kalibrierung waren, relativ zuverlässig vorhergesagt werden ($R^2=0,8363$). Die verwendete Kalibrierung wurde in diesem Falle aus Proben des gleichen Jahrganges erstellt, dem auch die untersuchten Proben entstammten. Proben der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft wurden ebenfalls chromatographisch untersucht. Die daraus berechneten Gebäckvolumina korrelierten jedoch mit den freundlicher Weise zur Verfügung gestellten Backergebnissen in wesentlich geringerem Maße ($R^2=0,5903$). Dieser Unterschied kann sowohl darauf zurückgeführt werden, dass die untersuchten Sorten nicht Teil des der Kalibrierung zugrunde liegenden Sortenspektrums war als auch, dass die Methodik der Backversuche verschieden ist. Ergebnisse der beiden bei der AGES untersuchten Jahrgänge ergaben bei Berechnung durch das jeweilige Modell des anderen Jahrganges ebenfalls schwächere Korrelationen. Daraus ist der Schluss zu ziehen, dass ein erheblicher Jahrgangs- und Umwelteinfluss auf das Zustandekommen der technologischen Eigenschaften besteht.

An Hand der B-Koeffizienten konnten die Einflüsse einzelner Peaks auf verschiedene Parameter geschätzt werden. Positiven Einfluss auf das Gebäckvolumen hat demnach ein Peak im Bereich der α -Gliadine mit einer Laufzeit von 19,06 Minuten. Vor allem aber waren zwei der Hauptpeaks aus der Fraktion der HMW-Glutenine positiv mit dem Gebäckvolumen korreliert. Ebenso zeigten zwei große Peaks der LMW-Glutenine eine positive Beziehung zum Gebäckvolumen. Ein Teil dieser Peaks war auch positiv mit der Teigenergie korreliert. Es zeigte sich jedoch, dass diese durch weitere Peaks der LMW-Glutenine, $\omega 5$ -, α -, γ - und $\omega 6$ -Gliadine positiv sowie von einem α -Gliadin Peak negativ beeinflusst wurde. Im Bereich der γ -Gliadine wurden vor allem Peaks mit negativem Einfluss auf den Dehnwiderstand gefunden. Der α -Gliadinpeak und ein LMW-Gluteninpeak

mit positivem Einfluss auf das Gebäckvolumen hatten auch positiven Einfluss auf den Dehnwiderstand, während zwei LMW-Gluteninpeaks mit negativem Einfluss identifiziert werden konnten. Peaks mit Einfluss auf den Dehnwiderstand hatten in den meisten Fällen einen entgegengesetzt gerichteten Einfluss auf die Dehnlänge.

Das T-Zellen stimulierende Epitop konnte in dem für Gebäckvolumen und Dehnwiderstand relevanten α -Gliadin-Peak sowie in einem ω 1,2-Gliadin und einem ebenfalls technologisch wichtigen HMW-Glutenin-Peak nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen der Proteinspektren von Braugersten zeigten, dass vor allem in der Albumin/Globulin-Fraktion Peaks mit positivem Einfluss auf die enzymatische Kraft des Malzes zu finden sind. Hordeine und Hordenine haben geringen bzw. eher negativen Einfluss auf Parameter wie Extraktausbeute und Diastatische Kraft. So konnten eher schwächere Modelle für die Extraktausbeute aus der Albumin- und Globulinfraktion (erklärte Variabilität Kalibrierung: 65%, $R^2=0,53$; Validierung 55%; Kalibrierung: $R^2=0,48$; 5 PC) und ein ausschließlich auf der Albumin- und Globulinfraktion beruhendes Modell für die Diastatische Kraft (erklärte Variabilität Kalibrierung: 62%, $R^2=0,61$; Validierung: 45%, $R^2=0,53$; 8 PC) berechnet werden. In den Hordeinen wurden zwei Peaks gefunden, die das möglicherweise pathogene α -Gliadin-Epitop enthielten.

Danksagung

Dem Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft wird für die Finanzierung des Projektes der Dank der Verfasser ausgesprochen.

Literatur

AMMAR K, KRONSTAD WE, MORRIS CF, 2000: Breadmaking quality of selected durum wheat genotypes and its relationship with high molecular weight glutenin subunits allelic variation and gluten protein polymeric composition. *Cereal Chem* 77: 230-236.

BALDSHIEV D, BUTEBA A, HANDRECK B, 1997: Untersuchungen der Beziehungen zwischen den Eiweissfraktionen und den technologischen Eigenschaften des Weizens. *Mühle Mischfuttertech* 134: 433-436.

BURNOUF T, BIETZ JA, 1984: Reversed-phase high performance liquid chromatography of reduced glutenin, a disulfide bonded protein of wheat endosperm. *J Chromatography* 299: 185-199.

MIR AN, ARABI MIE, AL-SAFADI B, 1999: High molecular weight glutenin subunits composition of Syrian grown bread wheat and its relationships with gluten strength. *J Genet Breed* 53: 237-245.

MITEA C, KOOY-WINKELAAR Y, VAN VEELLEN P, DE RU A, DRIJFHOUT JW, KONING F, DEKKING L, 2008: Fine specificity of monoclonal antibodies against celiac disease-inducing peptides in the gluteome. *Am J Clin Nutr* 88: 1057-1066.

PENA RJ, TRETOWAN R, PFEIFFER WH, VAN GINKEL M, 2002: Quality (end-use) improvement in wheat: compositional, genetic, and environmental factors. *J Crop Prod* 5: 1-37.

ROGERS WJ, SAYERS EJ, RU KL, 2001: Deficiency of individual high molecular weight glutenin subunits affords flexibility in breeding strategies for bread-making quality in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 117: 99-109.

SAPIERSTEIN HD, FU BX, 1998: Intercultivar variation in the quantity of monomeric proteins, soluble and insoluble glutenin and residue protein in wheat flour and relationships to breadmaking quality. *Cereal Chem* 75: 500-507.

SKERITT JH, HILL AS, 1990: Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *J Agric Food Chem* 38: 1771-1778.

SPAENJI-DEKKING EHA, KOOY-WINKELAAR EMC, NIEUWENHUIZEN WF, DRIJFHOUT JW, KONING F, 2004: A novel and sensitive method for the detection of T cell stimulatory epitopes of α/β - and γ -gliadin. *Gut* 53: 1267-1273.

WIESER H, KÖHLER P, 2008: The biochemical basis of celiac disease. *Cereal Chem* 85: 1-13.

WIESER H, ANTES S, SEILMEIER W, 1998: Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance-liquid-chromatography. *Cereal Chem* 75: 644-650.

Genetic resources of hulled wheat species in Czech organic farming

Petr Konvalina^{1*}, Ivana Capouchová² and Zdeněk Stehno³

Abstract

As organic farmers are searching for new market and sale opportunities, the organic farming system may grow and process a wider range of species than the conventional farming system. Concerning wheat especially the hulled wheat species einkorn, emmer wheat and spelt wheat are in recent years of growing interest for organic farmers. Field trials were carried out at three Czech locations from 2009 to 2010 to study the performance of 4 einkorn, 8 emmer wheat and 7 spelt wheat accessions. All trials were spring sown and bread wheat variety SW Kadrijl was used as check. The results show that some accessions of the hulled wheat species are inclined to lodging. On the other hand, they are resistant to foliar diseases, e.g. powdery mildew and leaf rust. Hulls serve as barriers against Fusarium head blight infection and therewith associated DON contamination of grains. Grain yield of hulled wheats is inferior compared to common wheat. Grains are characterised by high protein contents (up to 18.1%), however, protein quality is lower so that hulled wheats are not suitable to common baking procedures. Productivity of hulled wheat crops needs to be increased in order to extend their acreage in organic farming systems. The different technological and nutritional quality of hulled wheat species offers the possibility for new food products to be launched on the market and, hence, possibilities for regional marketing.

Keywords

Einkorn, emmer, genetic resources, spelt, *Triticum*, wheat

Introduction

Plant genetic resources are a unique non renewable resource of an improvement in the genetic base of field crops (ØSTERGÅRD et al. 2009). Genetic diversity has become more important during the last several years. Relevant resources of diversity and strategies for an implementation of genetic diversity in organic breeding programmes have to be identified (SERPOLAY et al. 2001).

Wheat is one of the most important crops for the organic farming system (WILLER and KILCHER 2009). It was initially grown and processed by people 10000 years ago as part of the Neolithic Revolution. Animal hunting and fruit gathering ceased to be primary means of living and a settled agriculture emerged and developed (SHEWRY 2009). Nowadays, common wheat (*Triticum aestivum* L.)

is the dominant cereal species worldwide (WILLER and KILCHER 2009). Einkorn (*Triticum monococcum* L.), emmer wheat (*Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl.) and spelt wheat (*Triticum spelta* L.) used to belong to the oldest domesticated species and they were also widespread (SUCHOWILSKA et al. 2009). Einkorn is an obsolete diploid cereal species being evidenced by archeologists 10000 years ago (WIESER et al. 2009). It spread to our region in the neolithic period (STEHNO 2001). Nowadays, einkorn is grown on a limited surface in Western Turkey, on the Balkan peninsula, in Italy, Spain, Switzerland, Germany (WIESER et al. 2009) and Austria. Emmer wheat is a tetraploid hulled wheat species. It has been traditionally grown and used as a part of the human diet (MARCONI and CUBADDA 2005). It is still grown as a minor crop in Ethiopia, India, Italy (MARINO et al. 2009) or in Turkey (GIULIANI et al. 2009). The hexaploid spelt wheat is considered to be an obsolete cultural European wheat species. It used to grow widespread in Central Europe in the past as it was (is) resistant to cold and is able to provide acceptable grain yields even on low fertility soils (FELDMAN 2001). Spelt wheat is nowadays mainly grown in Central and Western Europe, i.e. Germany, Switzerland, Austria, Czech Republic and Hungary (TROCOLI and CODIANNI 2005).

An abundance of information on positive as well as negative features of hulled wheat landraces is crucial determining their application in the breeding process and growing in sustainable farming systems (organic farming, low-input farming). Organic farmers seek varieties characterised by a higher genetic diversity and thereby ability to adapt to a farm's land and climatic conditions. A wider genetic diversity of varieties also enhances their ability to respond to unexpected environmental conditions (BECKER and LEON 1988, CECCARELLI et al. 2001, FINCKH 2008). Regarding the increasing requirements for diversity and quality of foodstuffs hulled wheat species have become more interesting and attractive (ZAHARIEVA et al. 2010). Therefore, organic farmers look for varieties characterised by a higher nutritional value and suitability for processing and production of a wide range of regional products, and, thereby, providing a competitive advantage for these organic farmers by offering unique products.

This work provides information on characteristics of hulled wheat genetic resources which can be valuable and important for sustainable farming systems. Objectives are: (a) an identification of weak points of hulled wheat landraces for organic farming; (b) an analysis of protein formation in

¹ University of South Bohemia, Faculty of Agriculture, Studentská 13, CZ-370 05 ČESKÉ BUDĚJOVICE

² Czech University of Life Sciences, Faculty of Agrobiolgy, Kamýcká 120, CZ-165 21 PRAGUE 6

³ Crop Research Institute, Drnovská 507, CZ-161 06 PRAGUE 6

* Ansprechpartner: Petr KONVALINA, konvalina@zf.jcu.cz

Table 1: List of used genetic resources

Accession name	Accession Id. ¹	Origin ²	Botanical variety ³
<i>Triticum monococcum</i> L.			
<i>Triticum monococum</i> 38	01C0204038	GEO	<i>hohensteinii</i> Flaksb.
<i>Triticum monococum</i> 44	01C0204044	ALB	<i>vulgare</i> Koern.
No. 8910	01C0204542	DNK	<i>macedonicum</i> Papag.
Schwedisches Einkorn	01C0204053	SWE	<i>vulgare</i> Koern.
<i>Triticum diccocom</i> (Schränk) Schuebl.			
Rudico	01C0200948	CZE	<i>rufum</i> Schuebl.
Weisser Sommer	01C0203993	DEU	<i>diccocom</i>
May-Emmer	01C0203990	CHE	<i>diccocom</i>
<i>Triticum dicoccon</i> (Brno)	01C0204022	CZE	<i>rufum</i> Schuebl.
<i>Triticum dicoccon</i> (Dagestan)	01C0204016	RUS	<i>serbicum</i> A. Schulz
<i>Triticum dicoccon</i> (Palestine)	01C0201261	ISR	<i>serbicum</i> A. Schulz
<i>Triticum dicoccon</i> (Tapioszele)	01C0201280	-	<i>semicanum</i> Koern.
<i>Triticum diccocom</i> (Tabor)	01C0204318	-	<i>rufum</i> Schuebl.
<i>Triticum spelta</i> L.			
<i>Triticum spelta</i> (Ruzyne)	01C0201257	CZE	<i>arduini</i> (Mazz.) Koern.
<i>Triticum spelta</i> (Tabor 22)	01C0204322	-	<i>duhamelianum</i> Koern.
<i>Triticum spelta</i> (Tabor 23)	01C0204323	-	<i>duhamelianum</i> Koern.
Spalda bila jarni	01C0200982	CZE	<i>album</i> (Alef.) Koern.
VIR St. Petersburg	01C0204865	CZE	<i>album</i> (Alef.) Koern.
<i>Triticum spelta</i> (Kew)	01C0200984	-	<i>caeruleum</i> (Alef.) Koern.
<i>Triticum spelta</i> No. 8930	01C0204506	-	<i>album</i> (Alef.) Koern.
<i>Triticum aestivum</i> L.			
SW Kadrlj	01C0104877	SWE	<i>lutescens</i> (Alef.) Mansf.

¹ EVIGEZ (http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/asp2/default_c.h)

² ISO 3166-1 A3 country codes (<ftp://ftp.fu-berlin.de/doc/iso/iso3166-countrycodes.txt>)

³ Classification according to DOROFFEV et al. (1979)

relation to grain yield; (c) an evaluation of basic parametres of technological (baking) quality.

Material and methods

Genetic resources of einkorn, emmer wheat, spelt wheat and common wheat (Table 1) were provided by the genebank of the Crop Research Institute, Prague-Ruzyně. The varieties were sown in a randomized, complete block design on organic fields in Prague (two sites) and České Budějovice (one site) in 2009 and 2010. Seeding rate was adjusted for a density of 350 germinable grains per m². Crop stands were treated in compliance with European legislation (European Council Regulation (EC) 834/2007, European Commission Regulation (EC) 889/2008). The experimental site of the University of South Bohemia, České Budějovice (USB), at 388 m a.s.l. is characterised by a mild warm climate, the soil is classified as pseudogley cambisol and the surface texture is sandy loam. The site of the Czech University of Life Sciences, Prague (CULS) at an altitude of 295 m a.s.l. is characterised by a warm and mid-dry climate, brown soil with a clay loam surface texture. The experimental site of the Crop Research Institute, Prague-Ruzyně (CRI), at 340 m a.s.l. is characterised by a warm, mid-dry climate, the soil is classified as degraded chernozem and the surface texture is clay and loam. Results of soil analysis are presented in Table 2. Climatic conditions of the experimental sites are demonstrated in Figure 1.

The following evaluations were carried out during the vegetation period: plant height (at the end of the flowering, DC69), lodging index (combination of intensity and degree of lodging; mean of two measurements: after heading, DC

59, and before harvest, DC 87), powdery mildew (DC37, 51-61, 77) and leaf rust infestation (DC 77) expressed on a 0 to 9 scoring scheme (0=totally infected; 9=no symptoms). After harvest grain yield and protein content were measured and protein yield was calculated.

Deoxynivalenol (DON) content was determined by the ROSA[®]-DON Quantitative test. The toxin was extracted from the grain sample (deionized water was used as a solvent), 100 µl of the extract was diluted in 1 ml of buffer. 300 µl of the diluted extract was applied on the test strip which was subsequently incubated for 10 min at 45°C (ROSA[®]-M Incubator). Results (in ppb) were assessed using the ROSA[®]-M Reader (Charm Sciences, Inc., Lawrence, MA).

After dehulling of grains the following quality traits were determined following standard methods of the International Association for Cereal Science and Technology (ICC): crude protein content (ICC 105/2), SDS sedimentation test

Table 2: Soil analysis of experimental sites

Site/year	pH	N-NH ₄	N-NO ₃	P	K	Ca	Mg
	(CaCl ₂)	(mg·kg ⁻¹)					
USB (České Budějovice)							
2009	5.91	15.5	8.1	120	65	114	1452
2010	6.67	2.42	7.3	111	86	1808	129
CULS (Prague-Uhřetivěves)							
2009	6.13	11.41	10.0	109	130	155	3134
2010	6.67	3.84	15.8	68	145	2837	143
CRI (Prague-Ruzyně)							
2009	7.20	19.9	9.0	130	298	202	5163
2010	7.43	4.64	12.2	109	380	5277	183

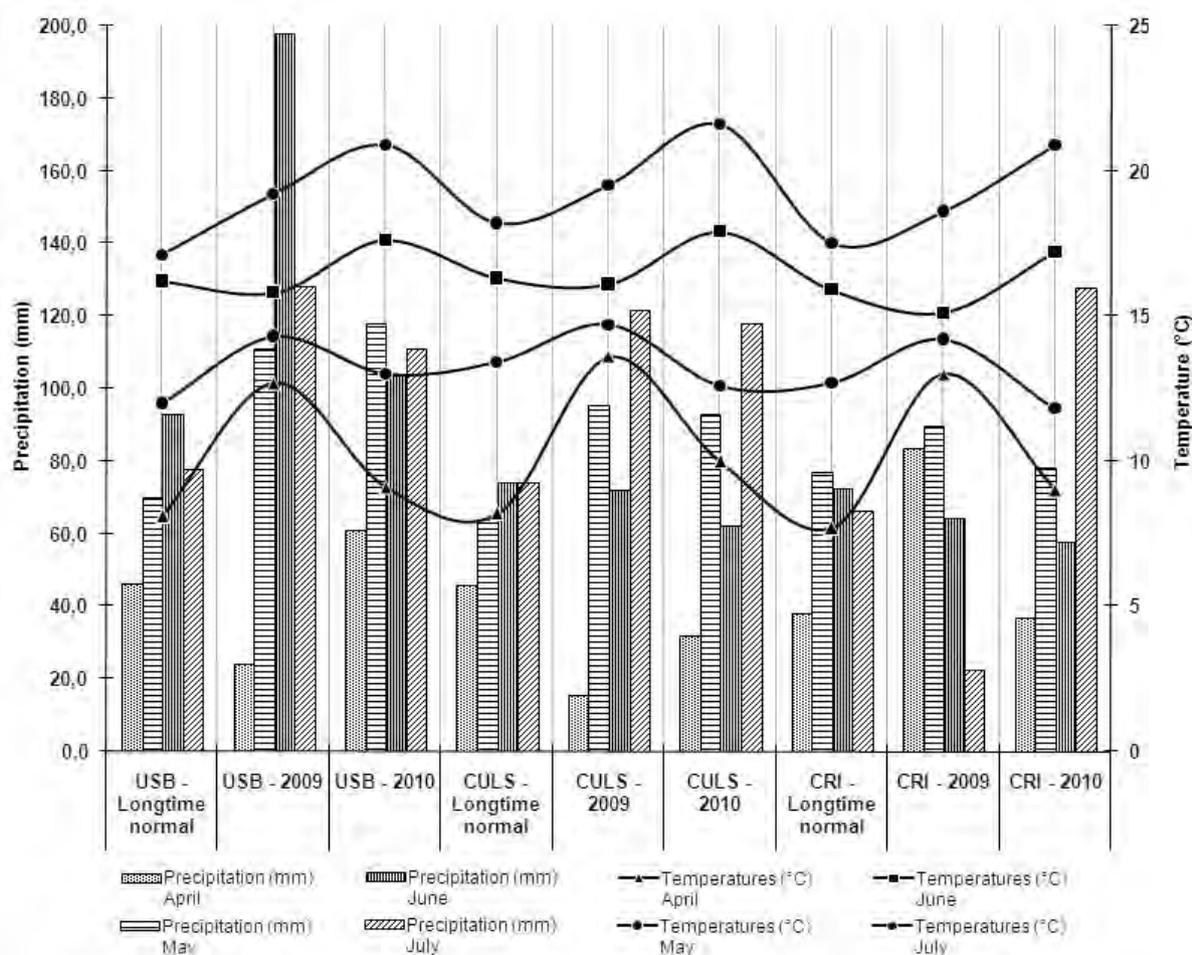


Figure 1: Climate conditions of the experimental sites

(ICC 151), wet gluten content (ICC 106/2) and gluten index (ICC 155).

Data were statistically processed by Statistica 9.0 software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK) program. Regression and correlation analyses were used for the evaluation of interdependence. Comparison of variety means were carried out by the Tukey HSD test.

Results and Discussion

A large amount of data were produced within the framework of our ongoing research. In the following only selected results will be presented revealing both advantages and disadvantages of hulled wheat genetic resources.

Plant height and resistance to lodging are two crucial factors in regard to weed competitiveness (CUDNEY et al. 1991, KONVALINA et al. 2010). Among the studied plant material variability of plant height was low (Table 3). The only exception was Schwedisches Einkorn with a mean of 100.4 cm. It was one of the most resistant accession against lodging. Increased plant height, however, does not automatically result in reduced resistance to lodging (PAGNOTTA et al. 2005) which was also observed in the present plant material for e.g. *T. dicoccon* (Dagestan) (plant height: 115.8 cm; lodging score: 4.7) and *T. dicoccon* (Tapioszele) (134.1 cm; 6.8). Resistance to lodging is more often determined by

the width and firmness than the length of the culm (KONVALINA et al. 2010). The results show that the choice of resistant cultivars or the improvement of lodging resistance should be the essential selection criteria.

A high resistance to pests and diseases is essential in natural-friendly farming systems since these systems are based on limited or no chemical protection (WOLFE et al. 2008). The majority of the tested hulled wheat accessions were resistant to powdery mildew (*Blumeria graminis*) and leaf rust (*Puccinia recondita*). *T. dicoccon* (Dagestan), *T. spelta* (Ruzyně) and *T. spelta* (Kew) were the only accessions with a slightly higher susceptibility to powdery mildew. In regard to leaf rust the einkorn and emmer accessions were highly resistant after natural infection, whereas the majority of spelt wheat accessions showed similar susceptibility than SW Kadrilj (Table 3). Our study showed that highly resistant genotypes to both foliar diseases are present in genetic resources stored in genebanks and that this material represents a valuable resource for wheat breeding (HEISEY et al. 1997, WOLFE et al. 2008).

Food safety is essential for sustainable farming systems especially in case of direct processing of products at farms. Infections with *Fusarium* spp. can result not only in yield losses, but also in a contamination of the grain by mycotoxins, e.g. deoxynivalenol (DON) (KÖHL et al. 2007,

Table 3: Agronomic traits of hulled wheat genetic resources (Means over three sites and two years; means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$)

Species/Accession	Plant height (cm)	Lodging (0-9)	Powdery mildew (0-9)	Leaf rust (0-9)	DON (ppb)
<i>Triticum monococcum</i>					
38	123.6 ^{b-g}	4.8 ^a	9.0 ^e	8.8 ^f	116.7 ^a
44	114.4 ^{bc}	4.7 ^a	9.0 ^e	8.8 ^f	350.0 ^{ab}
No. 8910	117.9 ^{b-c}	6.2 ^{ab}	8.9 ^{de}	8.8 ^f	80.0 ^a
Schwedisches Einkorn	100.4 ^a	6.7 ^{ab}	8.9 ^{de}	8.9 ^f	128.3 ^a
Mean + Std. dev.	114.1±9.9	5.6±1.0	9.0±0.1	8.8±0.0	168.8±122.3
<i>Triticum dicoccon</i>					
Rudico	128.1 ^{d-h}	7.0 ^{ab}	9.0 ^e	8.6 ^{ef}	23.3 ^a
Weisser Sommer	132.3 ^{f-h}	6.5 ^{ab}	9.0 ^e	8.7 ^f	21.7 ^a
May-Emmer	132.9 ^{f-h}	6.3 ^{ab}	9.0 ^e	8.7 ^f	33.3 ^a
Brno	113.9 ^b	4.8 ^a	8.9 ^{de}	8.6 ^f	158.3 ^a
Dagestan	115.8 ^{b-d}	4.7 ^a	8.5 ^{e-e}	8.4 ^{ef}	350.0 ^{ab}
Palestine	126.0 ^{b-h}	5.6 ^{ab}	8.6 ^{e-e}	8.3 ^{ef}	100.0 ^a
Tapiosezele	134.1 ^{gh}	6.8 ^{ab}	8.9 ^{de}	8.6 ^{ef}	791.7 ^b
Tabor	133.1 ^{f-h}	6.2 ^{ab}	9.0 ^e	8.4 ^{ef}	63.2 ^a
Mean + Std. dev.	127.0±8.0	6.0±0.9	8.9±0.2	8.5±0.2	192.7±265.5
<i>Triticum spelta</i>					
Ruzyne	129.8 ^{e-h}	5.4 ^{ab}	8.2 ^{b-d}	6.7 ^{b-d}	41.7 ^a
Tabor 22	119.9 ^{b-f}	6.0 ^{ab}	8.8 ^{e-e}	7.3 ^{cd}	83.3 ^a
Tabor 23	128.1 ^{d-h}	6.4 ^{ab}	8.8 ^{e-e}	6.8 ^{b-d}	133.3 ^a
Spalda bila jarni	127.3 ^{c-h}	6.5 ^{ab}	8.6 ^{e-e}	6.2 ^{ab}	120.8 ^a
VIR St. Petersburg	122.6 ^{b-g}	6.0 ^{ab}	8.6 ^{e-e}	6.6 ^{b-d}	70.0 ^a
Kew	137.5 ^h	5.0 ^a	8.2 ^{b-d}	7.6 ^{de}	83.3 ^a
No. 8930	122.5 ^{b-g}	5.8 ^{ab}	8.6 ^{e-e}	6.4 ^{a-c}	241.7 ^a
Mean + Std. dev.	126.8±5.9	5.9±0.5	8.5±0.3	6.8±0.5	110.6±65.4
<i>Triticum aestivum</i>					
SW Kadriř	88.7 ^a	8.25 ^b	8.7 ^{e-e}	6.2 ^{ab}	246.7 ^a

NEDĚLNÍK et al. 2007). In the present study DON contamination has not exceeded the EU regulated limit of 1250 ppb (EC regulation 1126/2007). Spelt wheat (110.6 ppb) and einkorn (168.9 ppb) were characterised by very low DON contamination. Generally, differences between accessions were negligible (Table 3). DON contamination was also low for emmer wheat with the exception of *T. dicoccon* (Tapiosezele) (791 ppb). Hulls play a role as resistance factor against *Fusarium* infection reducing mycotoxin contamination of the grain: they protect the grains and are removed before final processing of the grains (BUERSTMAYR et al. 2003). Yield stability is a priority in organic farming (WOLFE et al. 2008). However, farmers also need varieties with an economically profitable yield potential and a high end use quality. Due to the negative correlation between the grain yield and protein content protein yield per ha was used as indicator of interesting outliers. SW Kadriř exhibited a mean grain yield of 3.7 t·ha⁻¹. Mean grain yield of organically grown wheat in the Czech Republic was 3.14 t·ha⁻¹, while 5.29 t·ha⁻¹ was realised for conventional grown wheat (MZE 2009, 2010). The difference between organic and conventional yield is similar to data presented by other authors, i.e. 20 to 30% reduction (MÄDER et al. 2002, LAMMERTS VAN BUEREN et al. 2002). Einkorn and emmer wheat reached 57% and spelt wheat reached 70% of the yield of SW Kadriř. Einkorn accession No. 8910 (2.3 t·ha⁻¹), emmer wheat Rudico (2.9 t·ha⁻¹) and spelt wheat accessions Tabor 22, Tabor 23 and No. 8930 (2.3 t·ha⁻¹) were the highest yielding varieties of hulled wheat (Table 4). *T. spelta* No. 8930 reached a higher protein yield (475 kg·ha⁻¹) than SW Kadriř (450 kg·ha⁻¹) (Figure 2). Compared to SW Kadriř the group of einkorn wheats reached a relative protein yield of 72%, the emmer wheats

of 77%, and the spelt wheats of 94%. Within the species the accessions were significantly variable. This variability can be used for the selection of genotypes with acceptable protein yield and good end use quality.

Protein yield increased in relation to grain yield whereas protein content decreased with increasing grain yield (Figure 2). Emmer wheat varieties contained the highest concentration of protein (mean: 16.8%). *T. dicoccon* (Palestine) showed a mean protein content of 18.1% which is +5.8% compared to SW Kadriř. Mean contents for spelt wheat and einkorn were 16.5% and 15.8%, respectively. The high protein content of old landraces was also reported by several other authors (e.g. DOTLAČIL et al. 2002, 2010). Wet gluten content was high in all hulled wheat species (37.7-48.8%) whereas it reached only 27.3% in SW Kadriř. Contrary, einkorn and emmer wheat varieties showed low values of gluten index (12.7-20.7) and SDS sedimentation volume (18-45.7 ml). Their dough is usually sticky, is hard to work and baked products have an inferior baking volume (D'EGIDIO et al. 1993, ABDEL-AAL et al. 1997, CORBELLINI et al. 1999). Spelt wheat varieties reached higher gluten indices (37.6-48.8) and sedimentation volumes (46.2-70.2 ml). Therefore, spelt wheat varieties which are suitable for common baking procedures are available in the present genepool. Due to their inferior gluten quality einkorn and emmer wheat are not suitable for common baking procedures but they have to be used in a different way. Production of flour mixtures is one possibility. Moreover, there are a lot of products made from hulled wheat species, e.g. pasta, non yeast bread, biscuits, etc. (ABDEL-AAL and HUCL 2005, FRÉGEAU-REID and ABDEL-AAL 2005, MARCONI and CUBADDA 2005).

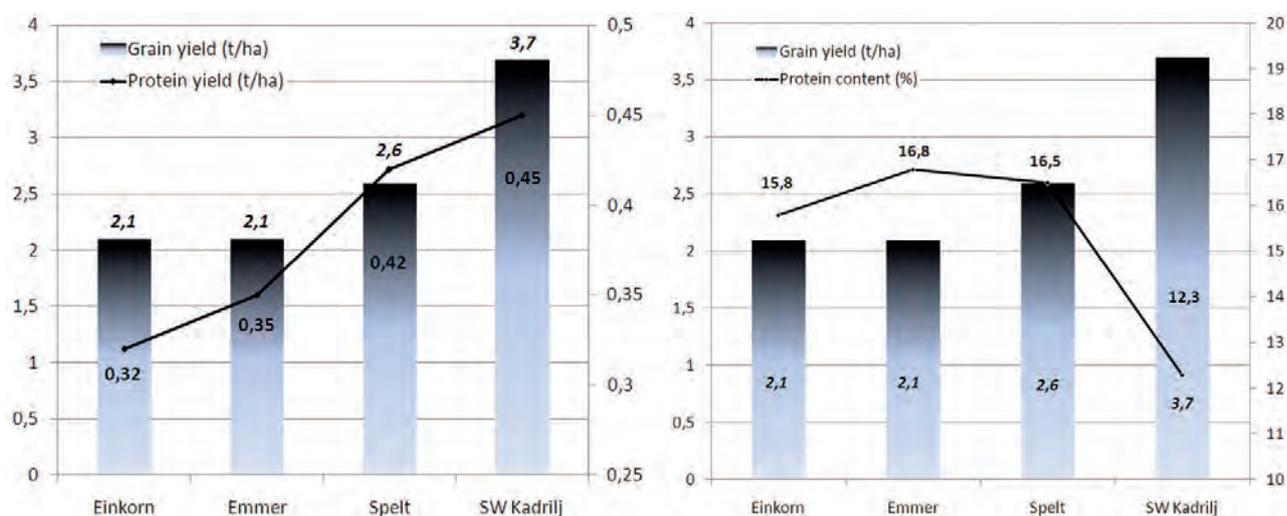


Figure 2: Grain yield, protein yield and protein content of hulled wheat species compared to common wheat variety SW Kadrij

Table 4: Grain yield and quality traits of hulled wheat genetic resources (Means over three sites and two years; means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$)

Species/Accession	Grain yield (t·ha ⁻¹)	Protein yield (kg·ha ⁻¹)	Protein content (%)	Wet gluten (%)	Gluten index	SDS sedimentation (ml)
<i>Triticum monococcum</i>						
38	2.1 ^a	338.8 ^{ab}	16.5 ^{c-h}	37.7 ^{b-f}	17.2 ^{ab}	36.7 ^{c-f}
44	1.9 ^a	301.4 ^{ab}	16.9 ^{fh}	38.3 ^{b-f}	12.8 ^a	36.3 ^{c-f}
No. 8910	2.3 ^{ab}	346.8 ^{ab}	15.3 ^{b-g}	39.2 ^{b-g}	14.8 ^a	19.2 ^{ab}
Schwedisches Einkorn	2.1 ^a	312.1 ^{ab}	14.6 ^{a-f}	38.9 ^{b-f}	15.2 ^{ab}	27.33 ^{a-c}
Mean + Std. dev.	2.1±0.2	324.8±21.5	15.8±1.1	38.5±0.7	15.0±1.8	29.9±8.3
<i>Triticum diccocom</i>						
Rudico	2.8 ^{ab}	432.3 ^{ab}	16.0 ^{c-h}	39.8 ^{b-g}	17.8 ^{ab}	41.0 ^{d-f}
Weisser Sommer	2.4 ^{ab}	398.5 ^{ab}	17.0 ^{fh}	43.0 ^{c-g}	20.7 ^{a-c}	45.7 ^{f-h}
May-Emmer	2.4 ^{ab}	390.2 ^{ab}	16.7 ^{fh}	40.9 ^{b-g}	16.8 ^{ab}	44.5 ^{e-g}
Brno	2.1 ^a	325.5 ^{ab}	15.8 ^{b-h}	38.3 ^{b-f}	12.3 ^a	22.7 ^{ab}
Dagestan	2.3 ^{ab}	345.3 ^{ab}	15.9 ^{b-h}	41.4 ^{b-g}	15.2 ^{ab}	18.0 ^a
Palestine	1.6 ^a	286.1 ^{ab}	18.1 ^h	42.3 ^{c-g}	13.1 ^a	28.7 ^{a-d}
Tapioszele	1.5 ^a	267.9 ^{ab}	17.4 ^{gh}	41.7 ^{b-g}	13.1 ^a	22.2 ^{ab}
Tabor	1.9 ^a	338.0 ^{ab}	17.2 ^{fh}	43.5 ^{c-g}	12.7 ^a	31.8 ^{b-e}
Mean + Std. dev.	2.1±0.4	348.0±56.4	16.8±0.8	41.4±1.7	15.2±3.0	31.8±10.8
<i>Triticum spelta</i>						
Ruzyne	2.5 ^{ab}	404.9 ^{ab}	16.2 ^{c-h}	43.3 ^{c-g}	39.3 ^{d-f}	46.2 ^{e-i}
Tabor 22	2.7 ^{ab}	453.2 ^b	16.3 ^{c-h}	43.9 ^{c-g}	38.8 ^{d-f}	59.7 ^{jk}
Tabor 23	2.7 ^{ab}	443.9 ^{ab}	16.7 ^{e-h}	44.3 ^{d-g}	34.7 ^{de}	61.3 ^{jk}
Spalda bila jarni	2.6 ^{ab}	443.8 ^{ab}	17.0 ^{fh}	47.1 ^g	32.7 ^{c-e}	61.5 ^{jk}
VIR St. Petersburg	2.6 ^{ab}	372.9 ^{ab}	15.1 ^{b-g}	37.6 ^{b-ef}	36.8 ^{de}	57.7 ^{h-k}
Kew	2.2 ^{ab}	364.1 ^{ab}	16.5 ^{d-h}	46.1 ^{e-g}	44.5 ^{e-g}	70.2 ^{kl}
No. 8930	2.7 ^a	475.0 ^b	17.5 ^{gh}	48.8 ^g	28.2 ^{b-d}	60.3 ^{jk}
Mean + Std. dev.	2.6±0.2	422.5±42.4	16.5±0.7	44.4±3.6	36.4±5.2	59.6±7.1
<i>Triticum aestivum</i>						
SW Kadrij	3.7 ^b	450.1 ^b	12.3 ^a	27.3 ^a	75.0 ^h	74.7 ^l

Conclusions

Hulled wheat landraces have a lot of favourable characteristics making the landraces very attractive, e.g. high protein content. Resistances to wheat diseases or the competitiveness to weeds are other positive aspects. In our study the following accessions were the most promising ones: einkorn No. 8910, emmer wheat varieties Rudico and Weisser Sommer, and spelt wheat No. 8930. Reduced resistance to lodging is a main weakness of old landraces. Spelt wheat varieties were less resistant to leaf rust and they reached

lower crop stand productivity values which may lead to reduced grain yield. End use quality traits are significant inferior compared to common wheat. Therefore, hulled wheat species provide an opportunity for the production of various food products which are very different from the conventional common wheat products.

Acknowledgements

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic - NAZV, Grant No. QH 82272.

References

- ABDEL AAL ESM, HUCL P, 2005: Spelt: a speciality wheat for emerging food uses. In: Abdel-Aal ESM, Wood P (Eds.), *Speciality grains for food and feed*, 109-142. Am Ass Cereal Chem, St. Paul, MN.
- ABDEL-AAL ESM, HUCL P, SOSULSKI FW, BHIRUD PR, 1997: Kernel, milling and baking properties of spring-type spelt and einkorn wheats. *J Cereal Sci* 26: 363-370.
- BECKER HC, LEON J, 1988: Stability analysis in plant breeding. *Plant Breed* 101: 1-23.
- BUERSTMAYR H, STIERSCHNEIDER M, STEINER B, LEMMENS M, GRIESSER M, NEVO E, FAHIMA T, 2003: Variation for resistance to head blight caused by *Fusarium graminearum* in wild emmer (*Triticum dicoccoides*) originating from Israel. *Euphytica* 130: 17-23.
- CECCARELLI S, GRANDO S, BAILEY E, AMRI A, EL-FELAH M, NASSIF F, REZGUI S, YAHYAOU A, 2001: Farmer participation in barley breeding in Syria, Morocco and Tunisia. *Euphytica* 122: 521-536.
- CORBELLINI M, EMPILLI S, VACCINO P, BRANDOLINI A, BORGHI B, HEUN M, SALAMINI F, 1999: Einkorn characterization for bread and cookie production in relation to protein subunit composition. *Cereal Chem* 76: 727-733.
- CUDNEY DW, JORDAN LS, HALL AE, 1991: Effect of wild oat (*Avena fatua*) infestations on light interception and growth rate of wheat (*Triticum aestivum*). *Weed Sci* 39: 175-179.
- D'EGIDIO MG, NARDI S, VALLEGA V, 1993: Grain, flour and dough characteristics of selected strains of diploid wheat, *Triticum monococcum* L. *Cereal Chem* 70: 298-303.
- DOROFEEV VF, FILATENKO AA, MIGUSHOVA EF, UDACZIN RA, JAKUBZINER MM, 1979: Wheat, Vol. 1. In: Dorofeev VF, Korovina ON (Eds.), *Flora of cultivated plants. Kolos, Leningrad* (in Russian).
- DOTLAČIL L, STEHNO Z, FABEROVÁ I, MICHALOVÁ A, 2002: Research, conservation and utilisation of plant genetic resources and agro-biodiversity enhancement - Contribution of the Research Institute of Crop Production Prague-Ruzyně. *Czech J Genet Plant Breed* 38: 3-15.
- DOTLAČIL L, HERMUTH J, STEHNO Z, DVOŘÁČEK V, BRADOVÁ J, LEIŠOVÁ L, 2010: How can wheat landraces contribute to present breeding? *Czech J Genet Plant Breed* 46: 70-74.
- FELDMAN M, 2001: Origin of cultivated wheat. In: Bonjean HP, Angus WJ (Eds.), *The world wheat book: a history of wheat breeding*, 3-56. Lavoiser Publishing, Paris.
- FINCKH MR, 2008: Integration of breeding and technology into diversification strategies for disease control in modern agriculture. *Eur J Plant Pathol* 121: 399-409.
- FRÉGEAU-REID J, ABDEL-AAL ESM, 2005: Einkorn: A Potential Functional Wheat and Genetic Resource. In: Abdel-Aal ESM, Wood P (Eds.), *Speciality grains for food and feed*, 37-62. Am Ass Cereal Chem, St. Paul, MN.
- GIULIANI A, KARAGÖZ A, ZENCIRCI N, 2009: Emmer (*Triticum dicoccon*) production and market potential in marginal mountainous areas of Turkey. *Mt Res Dev* 29: 220-229.
- HEISEY PW, SMALE M, BYERLEE D, SOUZA E, 1997: Wheat rusts and the costs of genetic diversity in the Punjab of Pakistan. *Am J Agric Econ* 79: 726-737.
- KÖHL J, KASTELEIN P, GROENENBOOM DE HAAS L, 2007: Population dynamics of *Fusarium* spp. causing Fusarium head blight. In: Vogelgsang S, Jalli M, Kovács G, Gyula V (Eds.), *Proc COST SUSVAR Workshop Fusarium diseases in cereals - potential impact from sustainable cropping systems*, 1-2 June, Velence, Hungary, pp 6-10. Risø National Laboratory, Denmark.
- KONVALINA P, CAPOUCHOVÁ I, STEHNO Z, MOUDRÝ J, Jr, MOUDRÝ J, 2010: Weaknesses of emmer wheat genetic resources and possibilities of its improvement for low-input and organic farming systems. *J Food Agric Env* 8: 376-382.
- LAMMERTS VAN BUEREN ET, STRUIK PC, JACOBSEN NE, 2002: Ecological concepts in organic farming and their consequences for an organic crop ideotype. *Neth J Agric Sci* 50: 1-26.
- MÄDER P, FLIESSBACH A, DUBOIS D, GUNST L, FRIED P, NIGGLI U, 2002: Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* 296: 1694-1697.
- MARCONI M, CUBADDA R, 2005: Emmer wheat. In: Abdel-Aal ESM, Wood P (Eds.), *Speciality grains for food and feed*, 63-108. Am Ass Cereal Chem, St. Paul.
- MARINO S, TOGNETTI R, ALVINO A, 2009: Crop yield and grain quality of emmer populations grown in central Italy, as affected by nitrogen fertilization. *Eur J Agron* 31: 233-240.
- MZE, 2009: Situační a výhledová zpráva obiloviny 2009, MZe, Praha.
- MZE, 2010: Ročenka ekologického zemědělství v České republice 2009. MZe, Praha.
- NEDĚLNÍK J, MORAVCOVÁ H, HAJŠLOVÁ J, LANCOVÁ K, VÁŇOVÁ M, SALAVA J, 2007: *Fusarium* spp. in wheat grain in the Czech Republic analysed by PCR method. *Plant Prot Sci* 43: 135-137.
- ØSTERGÅRD H, FINCKH MR, FONTAINE L, GOLDRINGER I, HOAD SP, KRISTENSEN K, LAMMERTS VAN BUEREN ET, MASCHER F, MUNKI L, WOLFE MS, 2009: Time for a shift in crop production: embracing complexity through diversity at all levels. *J Sci Food Agric* 89: 1439-1445.
- PAGNOTTA MA, MONDINI L, ATALLAH MF, 2005: Morphological and molecular characterization of Italian emmer wheat accessions. *Euphytica* 146: 29-37.
- SERPOLAY E, DAWSON JC, CHABLE V, LAMMERTS VAN BUEREN ET, OSMAN A, PINO S, SILVERI D, GOLDRINGER I, 2011: Diversity of different farmer and modern wheat varieties cultivated in contrasting organic farming conditions in western Europe and implications for European seed and variety legislation. *Org Agric* 1: 127-145.
- SHEWRY PR, 2009: Wheat. *J Exp Bot* 60: 1537-1553.
- STEHNO Z, 2001: Možnosti pěstování a využití pluchatých pšeníc. In: Michalová A, Lehká E (Eds.), *Pěstování a využití některých opomíjených a netradičních plodin v ČR*, 21 března, 4-7. VÚRV, Prague-Ruzyně.
- SUCHOWILSKA E, KANDLER W, SULYOK M, WIWART M, KRŠKA R, 2009: Mycotoxins profiles in the grain of *Triticum monococcum*, *Triticum dicoccon* and *Triticum spelta* after head infection with *Fusarium culmorum*. *J Sci Food Agric* 90: 556-565.
- TROCCOLIA, CODIANNI P, 2005: Appropriate seeding rate for einkorn, emmer, and spelt grown under rainfed condition in southern Italy. *Eur J Agron* 22: 293-300.
- WIESER H, MUELLER KJ, KOEHLER P, 2009: Studies on the protein composition and baking quality of einkorn lines. *Eur Food Res Technol* 229: 523-532.
- WILLER H, KILCHER L, 2009: The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends 2009. IFOAM, Bonn, and FiBL, Frick.
- WOLFE MS, BARESEL JP, DESCLAUX D, GOLDRINGER I, HOAD S, KOVACS G, LÖSCHENBERGER F, MIEDANER T, ØSTERGÅRD H, LAMMERTS VAN BUEREN ET, 2008: Developments in breeding cereals for organic agriculture. *Euphytica* 163: 323-346.
- ZAHARIEVA M, AYANA NG, AL HAKIMI A, MISRA SC, MONNEVEUX P, 2010: Cultivated emmer wheat (*Triticum dicoccon* Schrank), an old crop with a promising future: a review. *Genet Resour Crop Evol* 57: 937-962.

Purpurweizen - geht's noch bunter?

Steigerung des Anthocyangehaltes in Blaukorn-×Purpurweizen Kreuzungen

Increase of the total amount of anthocyanins in progenies of blue aleurone×purple pericarp wheat crosses

Johanna Baron¹, Susanne Siebenhandl-Ehn², Sharifah Nabihah Binti Syed Jaafar³,
Stefan Böhmdorfer³, Thomas Rosenau³ und Heinrich Grausgruber^{1*}

Abstract

Anthocyanins in wheat grains are expressed either in the pericarp (purple pericarp) or aleurone layer (blue aleurone). Due to their antioxidant activity anthocyanins are of increasing interest for nutritionists, food scientists and plant breeders. Previous studies revealed that different anthocyanins are present in wheat varieties carrying genes either for the purple pericarp or the blue aleurone trait. It was hypothesized that the total concentration of anthocyanins could be increased by combining the different genes for purple pericarp and blue aleurone. Progenies from one-, three- and four-way crosses between red, purple and blue grained varieties were selected over several cycles by visual scoring of seed colour. In 2011 bulks were evaluated for their total anthocyanin content by UV-VIS spectrophotometry. The results showed that the majority of the progenies were within the range of the purple and blue grained check varieties, however, single bulks were identified with increased anthocyanin concentration. Further studies (e.g. HPLC-MS) are ongoing to confirm the combination of anthocyanins in these progenies and to test the environmental stability of the pigmentation.

Keywords

Anthocyanins, antioxidant capacity, blue aleurone, purple pericarp, *Triticum aestivum*

Einleitung

Anthocyane gehören zu den pflanzlichen Sekundärmetaboliten. In der Klasse der Flavonoide bilden sie die größte Gruppe der wasserlöslichen Pigmente. Ihr Farbspektrum reicht von rot über blau bis hin zu violett und schwarz (ANTAL et al. 2003). In Pflanzen haben Anthocyane zwei wesentliche Funktionen. Zum einen sind sie als Blütenfarbstoff für die Anlockung von Bestäubern verantwortlich, zum anderen haben sie antioxidative Eigenschaften (ESCRIBANO-BAILÓN et al. 2004). Die antioxidative Eigenschaft ist auch

für die menschliche Ernährung interessant. *In vitro* Versuche zeigten im Vergleich zu Vitamin C und E wesentlich höhere antioxidative Kapazitäten. Weitere ernährungsphysiologische Bedeutung erhalten die Anthocyane durch ihre antikanzerogene, antimikrobielle, entzündungshemmende und antithrombotische Wirkung. Sie erhöhen desweiteren das HDL Cholesterin, beeinflussen den Blutdruck und Blutzucker und können die Dunkeladaptation des menschlichen Auges verbessern. Zu den bisher durchgeführten Studien ist allerdings anzumerken, dass es sich vielfach um *in vitro* Versuche handelte und die Konzentration der Anthocyane oftmals über der physiologisch verwertbaren lag. Dies ist vor allem auf die geringe Bioverfügbarkeit der Anthocyane zurückzuführen. Die ernährungsphysiologischen Effekte der Anthocyane können deshalb derzeit nicht sicher bewertet werden (WATZL et al. 2002, ANTAL et al. 2003).

Getreide ist eines der Hauptnahrungsmittel der Welt. Aufgrund der positiven Eigenschaften der Anthocyane und der immer größer werdenden Bedeutung gesunder Ernährung, werden blau- oder violettkörnige Weizen immer interessanter. Erstmals wurde blaukörniger Weizen wahrscheinlich in einem Brief mit Probenmaterial von Georg Kattermann, Freising, an Erich Tschermak von Seysenegg, Wien, erwähnt (KATTERMANN 1929). Ob diese Probe Ausgangsmaterial für die genetische Ressource Tschermaks Blaukorn war ist ungeklärt. Violette Weizenkörner wurden bereits zuvor vom Forschungsreisenden Johann Maria Hildebrandt von der Küste des Roten Meeres nach Europa gebracht.

Diese wurden 1879 der Öffentlichkeit vorgestellt, konnten jedoch aufgrund ihres schlechten Zustands nicht mehr ausgesät werden. Der violettkörnige Hartweizen wurde als *Triticum durum* var. *arraseita* klassifiziert (WITTMACK 1906, ZEVEN 1991). Erste züchterische Arbeiten wurden 1913 in Cambridge durchgeführt mit Material, welches 1905 aus Abessinien eingeführt wurde (CAPORN 1918). Durch mehrmalige Rückkreuzungen mit einer adaptierten Sorte in Neuseeland entsteht aus diesem Material 1981 die erste zugelassene hexaploide Purpurweizensorte Konini (COPP 1965, GRIFFIN 1987).

¹ Universität für Bodenkultur, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung für Pflanzenzüchtung, Konrad Lorenz Str. 24, A-3430 TULLN
² Universität für Bodenkultur, Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, Inst. für Lebensmitteltechnologie, Muthgasse 18, A-1190 WIEN
³ Universität für Bodenkultur, Department für Chemie, Abteilung für Organische Chemie, Holz-, Zellstoff- und Faserchemie, Konrad Lorenz Straße 24, A-3430 TULLN
* Ansprechpartner: Heinrich GRAUSGRUBER, heinrich.grausgruber@boku.ac.at

Bei den blaukörnigen Varietäten liegen die Anthocyane in der Aleuronschicht. Im Gegensatz dazu sind sie bei violettkörnigem Weizen in der Samenschale zu finden. Für die Ausprägung des blauen Aleurons (*blue aleurone*) sind zwei Gene verantwortlich (*Ba1* und *Ba2*). *Ba1* hat seinen Ursprung in der Quecke (*Agropyron* sp.); das Gen liegt in Chromosomentranslokationen (4BS·4EL oder 4BS·4BL-4EL) vor. *Ba2* stammt aus dem (wilden) Einkorn (*T. monococcum/boeoticum*) und ist als Chromosomensubstitution, (4A)4A^m bzw. (4B)4A^m, vorhanden (JAN et al. 1980, ZELLER et al. 1990, MORRISON et al. 2004). Für die violette Samenschale (*purple pericarp*) sind mehrere Gene beschrieben: *Pp1*, *Pp3a* und *Pp3b* (ehemals als *Pp2* bezeichnet). Die Gene liegen auf den Chromosomen 2A und 7B (DOBROVOLSKAYA et al. 2006). Von PIECH und EVANS (1978) und LI et al. (2010) wurde auch ein Gen auf Chromosom 3A lokalisiert.

Die Merkmale blaues Aleuron bzw. violette Samenschale wurden zunächst hauptsächlich als genetische Marker verwendet. So kamen sie beispielsweise in der Hybridzüchtung zum Einsatz (BARABÁS 1992, ZHOU et al. 2006), zur Bestimmung der Auskreuzungsrate (GRIFFIN 1987, HUCL und MATUS-CÁDIZ 2001, MATUS-CÁDIZ et al. 2004, HANSON et al. 2005, LAWRIE et al. 2006) oder zur Trennung verschiedener Weizenqualitäten (JENSEN et al. 1962, ST PIERRE et al. 1980). MORRISON et al. (2004) entwickelten auch ein Protokoll zur Auffindung von Apomixis in Weizen. Innovative Lebensmittel aus violettkörnigen Weizen wurden erstmals in Neuseeland auf den Markt gebracht (LINDLEY und LARSEN 1997). Seit 2006 gibt es mit der Marke PurPur auch in Österreich Vollkornprodukte aus Purpurweizen (GRAUSGRUBER et al. 2006a, BACKALDRIN 2008).

ABDEL-AAL et al. (2006) und GRAUSGRUBER et al. (2006b) zeigten mit HPLC, dass die vorhandenen Anthocyane von blau- und violettkörnigen Weizen unterschiedlich sind. Eine Steigerung des Gesamtanthocyangehaltes durch gezielte Kombination unterschiedlicher Anthocyanenetik sollte somit möglich sein. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob diese Hypothese in ausgewählten Nachkommenschaften von Blaukorn-×Purpurweizen Kreuzungen bestätigt werden kann.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Es wurden 15 Standardsorten (10 Purpur, 5 Blaukorn) sowie 76 Linien aus Einfach-, Dreiwege- und Doppelkreuzungen (Tabelle 1) untersucht. Bei Eltern und Nachkommenschaften handelte es sich sowohl um Winter- als auch Sommerweizen. Alle Proben stammten aus der Ernte 2011 vom Standort Raasdorf der Versuchswirtschaft Groß-Enzersdorf der Universität für Bodenkultur.

Chemische Analysen

Für die Extraktion der Anthocyane wurde das Probenmaterial mit einer Zyklonmühle (Modell Twister, Retsch, Haan) bei 12000 U·min⁻¹ und einem 1 mm Siebeinsatz vermahlen. Bis zur Extraktion wurde das Vollkornmehl bei -20°C gelagert.

Tabelle 1: Untersuchte Kreuzungskombinationen von violett- (Pp), blau- (Ba) und rotkörnigen (R) Weizen (reziproke Kombinationen nicht extra ausgewiesen)

Table 1: Analysed cross combinations of purple (Pp), blue (Ba) and red (R) grained wheat (reciprocal crosses are not indicated separately)

Einfachkreuzung	Dreiwegekreuzung	Doppelkreuzung
<i>R×Ba</i>	$(R×R)×Pp$	$(R×Ba)×(Ba×Pp)$
<i>R×Pp</i> ¹	$(R×Ba)×Pp$	$(R×Pp)×(R×Pp)$
<i>Ba×Pp</i>	$(R×Pp)×Ba$	$(R×Pp)×(Ba×Ba)$
	$(R×Pp)×Pp$	
	$(Ba×Ba)×Pp$	
	$(Ba×Pp)×R$	

¹inkl. einer tetraploiden Kreuzung

Die Anthocyanextraktion wurde mit leichten Veränderungen wie bei ABDEL-AAL und HUCL (1999) beschrieben durchgeführt. Hierzu wurde 1 g Vollkornmehl in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon™-Typ) eingewogen und 8 ml Lösungsmittel (MeOH:1 M HCl, 85:15, v/v, pH 0,95±0,05) hinzugefügt. Die Lösung wurde am Vortex Schüttler und anschließend auf einem Schüttler bei 150 U·min⁻¹ für 30 min inkubiert. Zur Trennung des Überstandes vom Feststoff wurden die Proben 5 min bei 4000 U·min⁻¹ zentrifugiert (Centrifuge 5810, Eppendorf AG, Hamburg). Die Überstände wurden in einem 25 ml Messkolben gesammelt und nach dreimaliger Extraktion auf das Endvolumen mit Lösungsmittel aufgefüllt.

Der Gehalt der Anthocyane wurde spektrophotometrisch bestimmt. Für die Kalibrierung des Spektrophotometers (U-1100, Hitachi Ltd., Tokyo) wurde das Standardpigment Cyanidin-3-glukosid (Extrasynthese, Genay) verwendet. Die Extrakte wurden bei einer Wellenlänge von 525 nm gegen das reine Lösungsmittel gemessen. Der Gesamtanthocyangehalt (TAC) in mg C-3-glc-Äquivalente·100 g⁻¹ Probe wurde nach folgender Formel berechnet:

$$TAC = \frac{\Delta E + 0,0556}{0,0761} \times \frac{\text{Extraktvolumen (mL)}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1}{\text{Einwaage (g)}} \times \frac{100}{\text{TM (\%)}}$$

Die gesamte TAC Variationsbreite wurde in neun Klassen aufgeteilt und die Frequenz der Kreuzungslinien in den entsprechenden Anthocyanklassen bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Ein Großteil der Kreuzungslinien haben Anthocyangehalte, die im Bereich der violett- bzw. blaukörnigen Standardsorten liegen (Abbildung 1). Es gibt jedoch auch Nachkommen, die höhere Anthocyangehalte als die *Ba* und *Pp* Standardsorten aufweisen, sowie weissekörnige (*r*) Nachkommen mit Gehalten niedriger als die rotkörnigen (*R*) Sorten. Der Gesamtgehalt an Anthocyanen konnte somit tatsächlich in manchen Linien durch die gezielte Kombination der *blue aleurone* und *purple pericarp* Genetik gesteigert werden. Eine weitere Steigerung des Anthocyangehaltes dürfte durchaus noch möglich sein, da die Pigmentierung der analysierten Proben (Ramsche mehrerer Ähren) teilweise noch nicht ganz einheitlich war. Die Linien sind hinsichtlich der Kornfarbe noch nicht vollständig homogen.

Ob die erhöhten Anthocyangehalte tatsächlich auf eine Kombination der Anthocyanenspektren von blau- und vio-

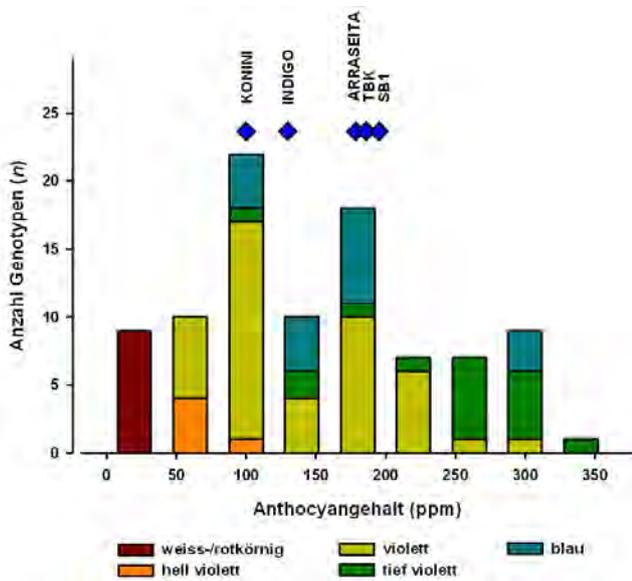


Abbildung 1: Anthocyangehalt (ppm) ausgewählter Standard-sorten und der Kreuzungslinien (Anzahl Linien in entsprechenden Anthocyan-Klassen; Kornfarbe entsprechend visueller Bonitur)

Figure 1: Total anthocyanin content (ppm) of selected check varieties and offspring (frequency of breeding lines in anthocyan classes; seed colour according to visual scoring)

lett-körnigen Weizen zurückzuführen ist wird derzeit mittels HPLC-MS überprüft. Erste Ergebnisse bestätigen die Kombination verschiedener Anthocyane für einzelne Genotypen die auf Grund der visuellen Kornbonituren (Abbildung 2) als tief violett eingestuft wurden. Die Selektion durch die visuelle Bonitur der Kornfarbe ist allerdings nur bedingt erfolgreich: zwar besitzt die Mehrheit der Genotypen mit hohen Gehalten eine tiefviolette Kornfarbe, es wurden aber auch Genotypen identifiziert die nur als violett bzw. blau eingestuft wurden und dennoch sehr hohe Anthocyangehalte zeigten. Umgekehrt wurden vereinzelt Genotypen als tief violett bonitiert deren Anthocyangehalt nur durchschnittlich ist (Abbildung 1). Neben den bekannten Hauptgenen dürfte die Intensität der Kornfarbe auch von Umwelteinflüssen und dem genetischen Hintergrund (pleiotropische bzw. epista-



Abbildung 2: Unterschiedliche Intensitäten der Kornfarbe: weiss, rot, hell violett, tief violett, blau, violett (im Uhrzeigersinn von links oben)

Figure 2: Different intensities of seed colour: white, red, light purple, dark purple, blue, purple (clockwise from top left)

tische Effekte) abhängig sein (DOBROVOLSKAYA et al. 2006, McINTOSH et al. 2008). Eine sichere Identifizierung der unterschiedlichen Gene wäre auch mit Hilfe molekularer Marker möglich, allerdings sind bisher nur für einige Gene molekulare Marker beschrieben (DUBCOVSKY et al. 1996, DOBROVOLSKAYA et al. 2006, SINGH et al. 2007, KHLESTKINA et al. 2010, LI et al. 2010).

Wie bereits erwähnt wird die Anthocyan-Biosynthese neben der Genetik auch von der Umwelt beeinflusst. Umwelteinflüsse die die Anthocyan-Biosynthese steigern können sind z.B. erhöhte UV-B Einstrahlung, kalte Temperaturen, Trockenstress und Ozonbelastung (CHALKER-SCOTT 1999). Durch das Auffinden optimaler Produktionsgebiete für die einzelnen Genotypen könnte somit ebenfalls eine höhere Konzentration an Anthocyanen erreicht werden.

Danksagung

Der Dank geht an Robert Metzger (OSU, Corvallis), Harold Bockelman (USDA-ARS, Aberdeen), Andreas Börner (IPK, Gatersleben), Zdenek Stehno (RICP, Praha), Wolfgang Kainz (AGES, Linz) und Michael Mackay (AWCC, Tamworth) für die Bereitstellung von Ausgangsmaterial.

Literatur

- ABDEL-AAL ESM, HUCL P, 1999: A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem* 76: 350-354.
- ABDEL-AAL ESM, YOUNG JC, RABALSKI I, 2006: Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *J Agric Food Chem* 54: 4696-4704.
- ANTAL DS, GÁRBAN G, GÁRBAN Z, 2003: The anthocyanins: biologically-active substances of food and pharmaceutical interest. *Ann Univ Dunarea de Jos Galati VI - Food Technol* 26: 106-115.
- BACKALDRIN, 2008: PURPUR-ne Geheimnisse. Presseinformation, Backaldrin Österreich - The Kornspitz Company GmbH, Asten.
- BARABÁS Z, 1992: A new era in the production of hybrid varieties? *Hung Agric Res* 1 (3): 17-21.
- CAPORN ASC, 1918: On a case of permanent variation in the glume lengths of extracted parental types and the inheritance of purple colour in the cross *Triticum polonicum \times *T. eloboni*. *J Genet* 7: 259-280.*
- CHALKER-SCOTT L, 1999: Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Phytochem Photobiol* 70: 1-9.
- COPP LGL, 1965: Purple grain in hexaploid wheat. *Wheat Inf Serv* 19-20: 18.
- DOBROVOLSKAYA O, ARBUZOVA VS, LOHWASSER U, RÖDER MS, BÖRNER A, 2006: Microsatellite mapping of complementary genes for purple grain colour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 150: 355-364.
- DUBCOVSKY J, LUO MC, ZHONG GY, BRANSTEITTE R, DESAI A, KILIAN A, KLEINHOF S, DVORAK J, 1996: Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics* 143: 983-999.
- ESCRIBANO-BAILÓN T, SANTOS-BUELGAC, RIVAS-GONZALO JC, 2004: Anthocyanins in cereals. *J Chromatography A* 1054: 129-141.
- GRAUSGRUBER H, SIEBENHANDL S, ETICHA F, BERGHOFER E, 2006a: Farbenspiel der Natur - Purpurgetreide. *Der fortschrittliche Landwirt* 9/2006: 60-61.
- GRAUSGRUBER H, SIEBENHANDL S, ETICHA F, BERGHOFER E, 2006b: Carotenoids and anthocyanins in wheat (*Triticum* sp.). *Vortr Pflanzenzüchtg* 69: 117-125.

- GRIFFIN WB, 1987: Outcrossing in New Zealand wheats measured by occurrence of purple grain. *NZ J Agric Res* 30: 287-290.
- HANSON BD, MALLORY-SMITH CA, SHAFII B, THILL DC, ZEMETRA RS, 2005: Pollen-mediated gene flow from blue aleurone wheat to other wheat cultivars. *Crop Sci* 45: 1610-1617.
- HUCL P, MATUS-CÁDIZ MA, 2001: Isolation distances for minimizing out-crossing in spring wheat. *Crop Sci* 41: 1348-1351.
- JAN CC, DVOŘÁK J, QUALSET CO, SOLIMAN KM, 1980: Selection and identification of a spontaneous alien chromosome translocation in wheat. *Genetics* 98: 389-398.
- JENSEN NF, TYLER LJ, DRISCOLL CJ, 1962: Markers for wheats of feed quality. *Ann Wheat Newsl* 8: 57-58.
- KATTERMANN G, 1929: Brief vom 17. Oktober an Professor Tschermak. Nachlass Erich Tschermak von Seysenegg, Österreichische Akademie der Wissenschaften, Wien.
- KHLESTKINA EK, RÖDER MS, BÖRNER A, 2010: Mapping genes controlling anthocyanin pigmentation on the glume and pericarp in tetraploid wheat (*Triticum durum* L.). *Euphytica* 171:65-69.
- LAWRIE RG, MATUS-CÁDIZ MA, HUCL P, 2006: Estimating out-crossing rates in spring wheat cultivars using the contact method. *Crop Sci* 46: 247-249.
- LI XP, LAN SQ, ZHANG YL, LIU YP, 2010: Identification of molecular markers linked to the genes for purple grain color in wheat (*Triticum aestivum*). *Genet Resour Crop Evol* 57: 1007-1012.
- LINDLEY TN, LARSEN NG, 1997: Cereal processing in New Zealand. Inversion, diversification, innovation, management. In: Campbell GM, Webb C, McKee SL (Eds.), *Cereals - Novel uses and processes*, pp. 273-279. Plenum Press, New York.
- MATUS-CÁDIZ MA, HUCL P, HORAK MJ, BLOMQUIST LK, 2004: Gene flow in wheat at the field scale. *Crop Sci* 44: 718-727.
- McINTOSH RA, YAMAZAKI Y, DUBCOVSKY J, ROGERS J, MORRIS C, SOMERS DJ, APPELS R, DEVOS KM, 2008: Catalogue of gene symbols for wheat. [Internet: <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/wgc/2008/>; verifiziert 20 Feb 2012]
- MORRISON LA, METZGER RJ, LUKASZEWSKI AJ, 2004: Origin of the blue-aleuron gene in Sebesta Blue wheat genetic stocks and protocol for its use in apomixis screening. *Crop Sci* 44: 2063-2067.
- PIECH J, EVANS LE, 1978: Monosomic analysis of purple grain colour in hexaploid wheat. *Z Pflanzenzüchtg* 82: 212-217.
- SINGH K, GHAI M, GARG M, CHHUNEJA P, KAUR P, SCHNURBUSCH T, KELLER B, DHALIWAL HS, 2007: An integrated molecular linkage map of diploid wheat based on a *Triticum boeoticum* \times *T. monococcum* RIL population. *Theor Appl Genet* 115: 301-312.
- ST PIERRE CA, GAUTHIER FM, PELLETIER GJ, BASTIEN D, 1980: Le blé de printemps Laval-19. *Can J Plant Sci* 60: 723-725.
- WATZL B, BRIVIBA K, RECHKEMMER G, 2002: Anthocyane. *Ernährungs-Umschau* 49: 148-150.
- WITTMACK L, 1906: Violette Weizenkörner. *Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin* 1906 (4): 103-108.
- ZELLER FJ, CERMEÑO MC, MILLER TE, 1990: Cytological analysis on the distribution and origin of the alien chromosome pair conferring blue aleurone color in several European common wheat (*Triticum aestivum* L.) strains. *Theor Appl Genet* 81: 551-558.
- ZEVEN AC, 1991: Wheats with purple and blue grains: a review. *Euphytica* 56: 243-258.
- ZHENG Q, LI B, LI H, LI Z, 2009: Utilization of blue-grained character in wheat breeding derived from *Thinopyrum ponticum*. *J Genet Genomics* 36: 575-580.
- ZHOU K, WANG S, FENG Y, LIU Z, WANG G, 2006: The 4E-*ms* system of producing hybrid wheat. *Crop Sci* 46: 250-255.

Anmerkung: Die Online-Version des Tagungsbandes enthält alle Abbildungen in Farbe und kann über die Homepage der Jahrestagung (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/> - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchertagung - Saatzüchertagung 2011) oder den korrespondierenden Autor bezogen werden.

Beispiele zur genetischen Variabilität bei diploiden Artkreuzungen zwischen Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne*) und Wiesenschwingel (*Festuca pratensis*)

Genetic variability of diploid hybrids between English ryegrass (*Lolium perenne*) and meadow fescue (*Festuca pratensis*)

Tatjana Lunenberg^{1*} und Stephan Hartmann

Abstract

The amount of meadow fescue (*Festuca pratensis*) in German swards decreased due to more intensive grassland production. As a consequence farmers sowed less and less grassland mixtures including higher percentages of *F. pratensis*. Hence, a new breeding program focused on *Festulolium* started in 2005 at the State Bavarian Research Centre for Agriculture. The main objective was to extend genetic diversity in *F. pratensis* for youth development and tolerance to intensive farming (*Festulolium* as transfer-species). One origin was the diploid Bavarian *Lolium perenne* gene pool with a high level of winter hardiness and fast mass growth after cutting. For initial crosses diploid *F. pratensis* plants were used. During summer 2011 the existing F₁, F₂ and BC₁ plants were evaluated. The tendencies of different varieties to inherit the traits heading date, mass growth, density, rust and leaf spot resistance, and fertility were estimated. The offspring of varieties Matiz, Kabota and Gladio got the best ratings of mass growth and density. The offspring of varieties Orleans and Gladio had highest seed yield. The male and female fertility could be partially restored via crossing different F₁ plants. GISH analyses of F₁ and BC₁ plants visualised the rapid loss of *Festuca* chromatin in further breeding generations. The existing plants form a highly variable initial population which can be used for further research and breeding and will be extended in the future.

Keywords

Diploid, *Festuca pratensis*, *Festulolium*, genetic variability, introgression, *Lolium perenne*

Einleitung

Die Tier- und Pflanzenwelt unterlag von Beginn an dem Zwang sich den verändernden Umweltbedingungen anzupassen. Die moderne Landwirtschaft ist jedoch auf eine schnellere Adaption angewiesen, um die Nahrungsmittelproduktion weltweit nachhaltig sichern zu können. Die Herausforderungen des Klimawandels erhöhen den Druck

zu rascheren Anpassungen. Hier liegt die Verantwortung im Bereich der Tier- und Pflanzenzüchtung. Sie hat seit den Anfängen der Landwirtschaft versucht, die Qualität und den Ertrag landwirtschaftlicher Produkte auch unter veränderten Rahmenbedingungen zu erhalten und zu verbessern.

Das bedeutet für den Bereich der Pflanzenzüchtung u.a. die Übertragung von Resistenzen oder Toleranzen gegen etablierte und auch neue biotische und abiotische Stressoren in leistungsfähige Zuchtsorten. So können Kulturpflanzen auch in Gebieten angebaut werden, die nicht den klimatischen Bedingungen des Ursprungslandes entsprechen oder sich an die Veränderung klimatischer Bedingungen anpassen. Voraussetzung ist hierzu das notwendige Maß an genetischer Variabilität im Ausgangsmaterial eines Zuchtprogrammes. Mit Hilfe des Einkreuzens von Merkmalen aus Landsorten, Wildpflanzen, der Auslösung von Mutationen oder dem Einsatz von Gentechnik kann die Variation im etablierten Material geschaffen werden.

Durch die heute in der landwirtschaftlichen Praxis höhere Nutzungsintensität verlor Wiesenschwingel (*Festuca pratensis* Huds.) in großen Teilen des bayerischen Grünlandes gegenüber anderen Arten stark an Konkurrenzkraft. Damit einher ging der Verlust seiner oft bestandsprägenden hohen Anteile in den Aufwüchsen (HEINZ und KUHN 2008). In Folge der Bestandsveränderung im Grünland nimmt auch seine Tonnage bei den eingesetzten Ansaat- und Nachsaatmischungen ab. Dies wiederum führt zu einer Verarmung des genetischen Pools nicht nur bayerischer Grünlandbestände.

Der Einsatz von *Festulolium* als Transferart hat am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung (IPZ) der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) das Ziel, durch die Verbesserung der Vielschnittverträglichkeit die Konkurrenzkraft des Wiesenschwingels durch rekurrente Rückkreuzungen zu erhöhen. Winterhärte und Wuchstyp von *F. pratensis* sollen dabei erhalten bleiben. Als Kreuzungspartner wurden Wiesenschwingel (*Fp*) und Deutsches Weidelgras (*Lolium perenne* L.) (*Lp*) ausgewählt. Letzteres ist das am stärksten züchterisch bearbeitete Futtergras und durch seine hervorragende Schmackhaftigkeit, Vielschnittverträglichkeit und hohen Ertrag sehr wertvoll. Der Wie-

¹ Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 4, D-85354 FREISING

* Ansprechpartner: Tatjana LUNENBERG, tatjana.lunenberg@lfl.bayern.de

senschwingel hat einen etwas geringeren Futterwert, wird im Grünland durch Vielschnitt aus dem Pflanzenbestand verdrängt, besticht jedoch durch seine Toleranzen gegenüber abiotischen Stress. Die Hybriden der Gattungen *Festuca* und *Lolium* werden als *Festulolium* bezeichnet.

Im Folgenden werden die bisherigen Ergebnisse von Arbeiten zur Artbastardisierung vorgestellt, die seit 2005 mit dem Ziel die genetische Variabilität bei Futtergräsern zu erhöhen bei IPZ laufen. Der erste Schritt für diesen Zuchtgang ist die Schaffung einer Ausgangspopulation, die sich durch Kreuzungsbarrieren jedoch als schwierig erweist. Vor allem die geringe männliche und weibliche Fertilität der F_1 Pflanzen stellt ein Problem für die weitere Züchtung dar. Um die gewünschte phänotypische und genetische Variabilität zu erzielen, müssen daher Methoden etabliert werden, die diese Kreuzungsbarrieren überwinden und das Material weiteren Züchtungsschritten zugänglich machen. Nach Etablierung der unter den Rahmenbedingungen der Arbeitsgruppe erfolgversprechendsten Methode sind folgende Fragen zu erörtern:

- (i) In welchem Umfang ist die Kombinationsfähigkeit von Wiesenschwingel und Deutschem Weidelgras von der Kombinationseignung einzelner Individuen oder Sorten abhängig?
- (ii) Gibt es Eigenschaften, die vorwiegend von bestimmten Einzelpflanzen oder Sorten vererbt werden?
- (iii) Treten bei der Kreuzung der Arten *F. pratensis* und *L. perenne* reziproke Effekte auf?
- (iv) Kann die Fertilität der F_1 Pflanzen wieder hergestellt werden?

Die vorliegende Arbeit sollte die genetische Variation der bereits vorhandenen *Festulolium* Population erfassen und Impulse für die folgenden Kreuzungsarbeiten geben.

Material und Methoden

Aufgrund unzureichenden Zuchtfortschrittes beim Merkmal Vielschnittverträglichkeit begann man an der LfL 2005 mit der Etablierung der Gattungsbastardisierung zur Erweiterung der genetischen Variabilität bei Gräsern. Aufgrund des zu bearbeitenden Genpools konzentrierte man sich bewusst auf Kreuzungen von diploidem Material bei Deutschem Weidelgras und Wiesenschwingel. Zu Beginn wurden verschiedene Methoden auf ihre Eignung unter den Rahmenbedingungen in der Arbeitsgruppe geprüft. Hierzu griff man auf bereits vorhandenes und vernalisiertes Sortenmaterial des Beobachtungssortiments (Parzellenanlage) zurück, da sich der Aufwand eines speziellen Anbaues noch nicht lohnte. Nach der grundsätzlichen Etablierung der Methode, die bei gegebenem Personalaufwand die höchste und sicherste Zahl an Kreuzungsprodukten ergab, wurde nur noch bei mangelnder Pflanzenverfügbarkeit 2007 und 2008 auf Material aus dem Beobachtungssortiment zurückgegriffen. Im Jahr 2006 konnten aufgrund eines Mitarbeiterwechsels keine Kreuzungen durchgeführt werden.

Kreuzungstechnik

Einzelne im Freiland vernalisierte Mutterpflanzen wurden im April vor dem Ährenschieben aus dem Zuchtgarten ausgegraben und ins Gewächshaus umgesiedelt. Hier konnte der Zeitpunkt der Blüte je nach Bedarf vorgezogen

oder verzögert werden, d.h. die Blühzeitpunkte der beiden Elternpflanzen wurden synchronisiert. Das war nötig, da die verwendeten Sorten des Deutschen Weidelgrases aus allen Reifegruppen stammten und damit für das Merkmal Ährenschieben einen Zeitraum von etwa 5 Wochen abdeckten, während die Variabilität bei Wiesenschwingel für dieses Merkmal deutlich geringer war. Laut Bundessortenamt (BSA) betrug diese für die Masse der Sorten lediglich 6 Tage. Erst mit der Zulassung der Sorte Kolumbus wurde diese Spanne 2004 auf 12 Tage ausgeweitet (BSA 2009). Der Zeitraum für das Ährenschieben bei Wiesenschwingel deckte sich somit bei den meisten Sorten mit dem Zeitraum der Weidelgrassorten mit der Einstufung früh bzw. früh bis mittel. Aufgrund der kompakteren Ährenform, die eine leichtere und sichere Kastration versprach, wurde im Regelfall Deutsches Weidelgras als Mutterpflanze verwendet. Im Jahr 2011 wurde erstmals die Eignung von Wiesenschwingel in Bezug auf praktische Handhabbarkeit als Mutterpflanze geprüft. Von Interesse war die Frage, ob evtl. maternale Effekte am verwendeten Material beobachtet werden können.

Kurz vor der Blüte wurden die Ähren oder Rispen kastriert. Mit Hilfe einer Pinzette wurden pro Blütchen drei Antheren entfernt. Der optimale Zeitpunkt für die Kastration war kurz vor dem Austritt der Antheren aus den Blütchen. Kastrierte Ähren oder Rispen wurden mit Papiertüten isoliert, fixiert und fortlaufend nummeriert. Ein bis zwei Tage nach der Kastration waren im Idealfall die Narbenfäden deutlich zu erkennen und es konnte bestäubt werden. Eine Ähre des Deutschen Weidelgrases war, durch die überschaubare Anzahl Blütchen pro Ähre, schneller zu kastrieren als die Doppeltrauben des Wiesenschwingels, so dass *L. perenne* als Mutterpflanze bevorzugt wurde.

Die Pollenspender blühten an einem windstillen Ort. Kurz vor der Blüte wurden 20 Ähren oder Rispen pro Pflanze abgeschnitten und in mit Wasser gefüllte Gefäße gestellt. Dadurch ging der Pollen nicht vor der Bestäubung verloren. Der Stress des Abschneidens und die starke Temperaturerhöhung bewirkten ein starkes Vorziehen des Blühzeitpunktes.

Zur Bestäubung wurden die Isoliertütchen von den Ähren oder Rispen entfernt und der Pollen des jeweiligen Elters darüber gestäubt. Um die Sicherheit der Bestäubung zu erhöhen, wurde aufgrund der Blühbiologie dies an mehreren aufeinander folgenden Tagen wiederholt. Grund hierfür ist, dass nicht alle Blütchen einer Ähre gleichzeitig blühen. Nach Möglichkeit wurde pro Ähre bzw. Rispe immer dieselbe Vaterpflanze verwendet. War dies nicht möglich, griff man auf eine andere Pflanze der gleichen Sorte zurück. Nach der Bestäubung wurden die Ähren oder Rispen wieder mit Papiertütchen isoliert. Ob der Bestäubung eine Befruchtung folgte, war durch das Einziehen der Narbenfäden zu erkennen, ungefähr zwei Tage nach der ersten Bestäubung. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Dicamba 3,6-Dichlor-2-methoxybenzoesäure) Lösung (synthetisches Auxin) in den Halm gespritzt. Der Einstich erfolgte knapp über dem letzten Halmknoten. Eine weitere Einstichstelle wurde direkt unter dem basalen Ährchen gesetzt. So wurde die erfolgreiche Injektion der Flüssigkeit überprüft. Mit Vaseline wurden die verletzten Stellen des Halmes verschlossen, um das Absterben des Triebes zu verhindern. Die Hormonlösung förderte die Entwicklung von Embryonen.

In den Isoliertütchen begannen sich Karyopsen zu bilden. Es folgte der *embryo rescue* Schritt. Zwei Wochen nach der Bestäubung schnitt man die Ähren oder Rispen ab und extrahierte die Karyopsen aus den Blüten. Die Karyopsen wurden desinfiziert und unter dem Binokular auf Embryonen überprüft. Waren diese vorhanden, wurden sie aus dem distalen Bereich der Karyopsen herausgeschnitten. Erleichtert wurde dieser Vorgang durch das wässrige Endosperm. Karyopsen die Mehlkörper gebildet hatten, wurden bei der Herstellung von F_1 Pflanzen als Selbstung aussortiert. Durch die *seed incompatibility* zwischen *Festuca* und *Lolium* wurde davon ausgegangen, dass es zu keiner doppelten Befruchtung kommt. Das heißt, der Spermakern verschmolz nicht mit dem diploiden Embryosackkern zum triploiden Endospermkern und es entstand kein funktionsfähiges Endosperm (GYMER und WHITTINGTON 1973). Bei Rückkreuzungen wurden auch diese Embryonen extrahiert. Die Embryonen wurden in Petrischalen auf Nährmedium gesetzt. Die Spross- und Wurzelbildung setzte bei Raumtemperatur und Dunkelheit ein. Nach weiteren Schritten, in denen die Pflänzchen immer wieder umgesetzt wurden, um Hygiene und Nährstoffvorrat zu erhalten und durch Lichteinwirkung die Chlorophyllbildung anzuregen bzw. zu ermöglichen, wurden sie zwei Monate nach Rettung des Embryos in die Erde gesetzt. Zum Frühjahr hin wurde jede Pflanze dreifach verklont und an zwei Standorten ausgepflanzt. Ein Klon verblieb im Gewächshaus, um Ausfälle auf dem Feld nachpflanzen zu können. So konnte jeder Genotyp an einem Standort (Labor oder Pulling) beerntet werden und verblieb am anderen durch häufigen Schnitt zur Erhaltung im vegetativen Stadium. Letzteres ist nötig, um das Ausfallen von Samen in den Klon selbst zu vermeiden, da in diesem Fall die Gefahr genetisch uneinheitlicher Mischhorste aus Elter und Nachkommen bestehen würde. Der Kreuzungserfolg aus dem Jahr 2005 ging 2008 in die Klonbeobachtung. Im Jahr 2007 blühten ausgewählte Hybriden der Kreuzung 2005 in Weizenisolationen frei ab. Gleichzeitig versuchte man im Gewächshaus die Rückkreuzung mit Wiesenschwingel durch freies Abblühen zu erreichen. Durch mangelnde Blühsynchronisation der Pflanzen war dieses Vorhaben nicht erfolgreich und die Pflanzen blühten ebenfalls frei ab. Aus beiden Versuchen wurde Saatgut geerntet. In den folgenden Jahren ging man zur Erzeugung der Rückkreuzungen wie bei der Herstellung der F_1 Pflanzen vor.

Im Jahr 2011 wurden aus arbeitswirtschaftlichen Erwägungen (Optimierung des Arbeitskraftbedarfs pro grüner verifizierter Nachkommenpflanze) die *Festulolium* (FEL) Pflanzen aufgrund der gewonnenen Erfahrung mit der männlichen Sterilität der geplanten Mutterpflanzen nicht kastriert und direkt in Papiertüten isoliert, mit Wiesenschwingelpollen bestäubt, Dicamba gespritzt und die Embryonen extrahiert.

Genetische Analysen

Um die Gattungskreuzung zu verifizieren und somit Selbstungen auszuschließen, wurden die Nachkommen mit Hilfe von AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) genetisch analysiert. Hierzu musste jede Probe mindestens 100 mg Blattmaterial umfassen. Pro Pflanze wurden eine

A und einen B Probe gezogen, die dann gefriergetrocknet und gemahlen wurden. Das Fingerprinting der DNA erfolgte in drei Schritten: (1) Restriktion der DNA und Ligation oligonukleotider Adapter, (2) selektive Amplifikation ausgewählter Restriktionsfragmente und (3) Gelanalyse der amplifizierten Fragmente. Restriktionsfragmente wurden durch selektive PCR mit Hilfe von vier Primerkombinationen amplifiziert (VOS et al. 1995).

Für die GISH (*Genomic In Situ Hybridization*) Analyse, die von Dr. David Kopecký (Institute of Experimental Botany AS CR, Olomouc, CZ) durchgeführt wurde, mussten saubere, frische Wurzelspitzen fixiert werden. Insgesamt wurden 60 Pflanzen in Hydropony, einer Hydrokultur mit spezieller Nährlösung, kultiviert.

Merkmalsbonituren

Die Bonituren wurden eng angelehnt an die *Richtlinien für die Durchführung von landwirtschaftlichen Wertprüfungen und Sortenversuchen* sowie den *Richtlinien zur Prüfung der Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit* durchgeführt (BSA 2000, UPOV 2002). Die Pflanzen wurden entweder als Einzelpflanze oder in einer Klonbeobachtung bewertet.

Da die Ausbeute an Embryonen aus der F_1 Generation aufgrund der schlechten Fertilität sehr gering war, wurden Merkmale zur Bestimmung der Fertilität erhoben. Zum einen wurde der Samenertrag von einigen Pflanzungen erfasst. Normalerweise handelte es sich dabei um die Pflanzungen in Pulling. Bei den Pflanzungen am Labor sollten die Einzelpflanzen erhalten bleiben. Zum anderen wurden die Anzahl Embryonen pro entwickelte Körner und Anzahl entwickelter Pflanzen gewertet. Zusätzlich versuchte man, die männliche Fertilität der Nachkommen zu erfassen. Dazu wurde der Pollen mit Iod-Kaliumiodid-Lösung (Lugol'sche Lösung) angefärbt. Bei allen Bonituren wurde die Ausprägung des Merkmals erhoben, das heißt hohe Noten waren z. B. bei der Bonitur Massenbildung als positiv, bei der Bonitur Anfälligkeit gegenüber Rost als negativ zu bewerten.

Statistik

Die Daten wurden je nach Struktur entweder mit einer üblichen Varianzanalyse ausgewertet oder ein gemischtes Modell (*mixed model*) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit SAS Vers. 9.2 (SAS Institute, Cary, NC). Für die Bonituren Massenbildung und Dichtigkeit kam die Prozedur MIXED zum Einsatz, die sowohl die wiederholte Bewertung der Einzelpflanzen innerhalb eines Jahres (*repeated measurements*) als auch verschiedene Bonitur- und Nutzungsjahre miteinbeziehen konnte. Die übrigen Bonituren wurden mit der Prozedur GLM analysiert. Auch wenn die Standorte Pulling und Labor räumlich nahe lagen, wurden sie als verschiedene Orte gewertet. Bei Vergleichen zwischen Eltern und Nachkommen wurde auf den Standort Labor zurückgegriffen, da sich nur dort Elternpopulationen befanden. Beim Vergleich der Nachkommenschaften untereinander wurden beide Standorte herangezogen. Der Samenertrag wurde nur an jeweils einem Standort erfasst. Der Kreuzungserfolg 2005 und 2008 wurde am Standort Labor beerntet, während die übrigen Pflanzen am Standort

Pulling beerntet wurden. Die geschätzten Prozentzahlen bei der Bonitur der Pollenfertilität wurden vor der Auswertung mit $\sin\sqrt{x}$ transformiert. Da es sich bei der Auswertung der weiblichen und männlichen Fertilität und des Merkmals Ährenschieben, um jeweils Erhebungen an einem Ort handelte, wurde nur die Variable Familie als Einflussfaktor gewertet. Bei der Auswertung der Krankheitsbonituren wurde der Faktor Ort mit einbezogen. Für die Auswertung der mehrfach wiederholten Bonituren auf Massenbildung und Dichtigkeit wurde jeweils das gemischte Modell angewendet.

Ergebnisse

Genetische Analysen

Bei der AFLP Analyse des Rückkreuzungserfolgs 2010 konnten bei jedem Nachkommen vier Markerstellen gefunden werden, die sowohl die Rückkreuzung verifizierten als auch den Vater identifizierten. Bei späteren Züchtungsgenerationen ist zu erwarten, dass eine höhere Anzahl an Primerkombinationen nötig sein wird. Mit der GISH Methode konnten die *Festuca* und *Lolium* Chromosomen unterschiedlich angefärbt werden. Unter den zu verifizierende F_1 Pflanzen wurden acht Pflanzen als Nachkommen nur von Weidelgras identifiziert. In den meisten Fällen lieferte die AFLP Analyse die gleichen Ergebnisse. Ausnahme waren die Pflanzen FEL26 und FEL27 aus dem Kreuzungsjahr 2007. Dabei handelte es sich um NK Niata. Nach Auswertung der AFLP Daten wurden diese als Kreuzungen identifiziert.

Es wurden zwei BC Pflanzen aus dem Jahr 2010 und fünf Pflanzen aus dem Jahr 2011 untersucht. Nicht alle Wurzelspitzen wiesen eine ausreichende Qualität auf, um die Untersuchung durchzuführen. Von den Pflanzen die mit hinreichender Sicherheit untersucht werden konnten, wiesen vier der Pflanzen aus 2011 mehr *Lolium* als *Festuca* Chromosomen auf. Eine Pflanze aus 2010, die analysiert werden konnte, dagegen 8 *Festuca* und 6 *Lolium* Chromosomen. Nur bei dieser letzten Pflanze konnte man von einer erfolgreichen Rückkreuzung zu *Festuca* ausgehen. Bei den anderen handelte es sich um Rückkreuzungen zu *Lolium*. Es fand sich auch eine Pflanze, die nahezu triploid war. Bei diesen Pflanzen war meist ein rapider Verlust an *Festuca* Chromatin zu beobachten. In jeder der BC Pflanzen waren Translokationen nachweisbar.

Fertilität und Kreuzungsnachkommen

Bei der Analyse der Variable „Erhaltene Nachkommen pro kastrierter Ähre“ innerhalb der verwendeten Deutschen Weidelgräser konnte nur die Sorte Barata ein signifikant besseres Niveau als die übrigen *Lp* Sorten erreichen. Allerdings wurde von dieser Pflanze im Jahr 2011 nur eine Ähre kastriert. Dadurch war nur der Wert einer Wiederholung verfügbar. Die errechnete Signifikanz steht also auf einer sehr geringen Datenbasis, die erst durch weitere Ergebnisse bestätigt werden muss. Immerhin erhielt man aus dieser Barata Ähre 17 Nachkommen. Absolut gesehen war die Sorte Ivana im Vergleich der Deutschen Weidelgräser mit einem Maximum von 26 Nachkommen pro kastrierter Ähre im Jahr 2010 am erfolgreichsten. Bezogen auf *Lp* und *Fp* war

eine Einzelpflanze aus einem Wiesenschwingel Polycross, WSC 29/7, mit 73 Nachkommen pro kastrierter Ähre am ertragreichsten. Bei einem Vergleich der zwei verwendeten Wiesenschwingel mit allen *Lp* Pflanzen stellte sich auch die bereits genannte Einzelpflanze WSC 29/7 als signifikant am besten heraus, wobei sie eine Spannweite von 6 bis 73 Nachkommen pro Ähre aufwies.

Der Unterschied bezüglich der Anzahl der erhaltenen Nachkommen bezogen auf die Anzahl extrahierter Körner war zwischen den F_1 Pflanzen und Wiesenschwingel als Mutter bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% signifikant verschieden. Deutsches Weidelgras unterschied sich weder von Wiesenschwingel noch von den F_1 *Festulolii*. Damit ließ sich für das verwendete Material die Aussage treffen, dass Wiesenschwingel tendenziell mehr Embryonen pro Anzahl angelegter Körner bildete. Eines der Hauptprobleme bei der Herstellung von F_1 und BC_1 Nachkommen war, dass oft nicht nur die Endosperm Bildung unterblieb, sondern, dass in den Karyopsen auch die Embryonen fehlten.

Der Erfolg der Kreuzung von Hand hing nicht nur von der Kombinationsfähigkeit der Elternpflanzen ab, sondern hauptsächlich von der technischen Handhabung der Kreuzung. Da die Narbenfäden einer Ähre gestaffelt aus den Spelzen hervortraten, wurden sie mehrmals bestäubt. Fraglich war, ob vom Pollenalter zwei bis drei Tage nach der ersten Bestäubung immer noch genug Pollen zur Verfügung stand und dieser überhaupt noch fertil war. Bei der Verwendung von Wiesenschwingel als Mutterpflanze konnten wesentlich mehr fertile Pflanzen gewonnen werden, wenn deren Zahl auch stark schwankte. Da die Pflanzen aber zum Zeitpunkt des Beitrages noch nicht als Kreuzungsnachkommen verifiziert waren, ist dieses Ergebnis bis dahin nur als Hinweis zu werten. Der Grund für das günstige Ergebnis des Wiesenschwingels lag vermutlich nicht am Einsatz des Wiesenschwingels als Mutterpflanze, sondern daran, dass Deutsches Weidelgras als Vaterpflanze verwendet wurde. Bei einigen Testanfärbungen mit Lugol'scher Lösung erschien der Pollen von Deutschem Weidelgras fertiler. Eventuell war also die zu den bisher üblichen Kreuzungen reziproke Kreuzung aufgrund der Vater- und nicht der Mutterpflanze erfolgreicher. Bei den Rückkreuzungen war, wie die GISH Untersuchungen zeigten, ebenfalls Weidelgraspollen wesentlich erfolgreicher. Vor allem bei der Rückkreuzung sollte also in Zukunft auf eine sehr gründliche Isolierung geachtet werden. Gerade die starken Schwankungen bei Betrachtung nur einer Pflanze ließen auf die starken Effekte der mechanischen Belastung und die Blüte schließen.

Bezüglich der Fertilität der F_1 Generation ($Lp \times Fp$) gegenüber der F_2 Generation (FEL \times FEL und FEL \times ?) und BC_1 *Fp* Pflanzen (FEL \times *Fp*) zeigte sich, dass die männliche Fertilität durch Rückkreuzung mit *Lp* oder Erstellung der F_2 Generation wieder restauriert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte bei der BC_1 *Fp* nur bei individuellen Pflanzen eine hinreichende männliche Fertilität festgestellt werden. Zu beachten war, dass bei den F_2 Pflanzen ein hohes Maß an Variabilität vorhanden war und somit nicht alle Pflanzen fertil waren. Bei einer Pflanze wurde gar keine Antherenbildung beobachtet. Beim Vergleich der F_1 Pflanzungen mit den F_2 Pflanzungen Nr. 163 (FEL \times ?) und Nr. 164 (FEL \times FEL)

und den BC₁ Pflanzen bezüglich Pollenfertilität konnten signifikante Unterschiede zwischen F₁ Pflanzungen und den F₂ Pflanzungen Nr. 163 und Nr. 164 festgestellt werden. Die BC₁ unterschied sich nicht signifikant von der F₁. Tendenziell wiesen die Pflanzen der Pflanzung Nr. 163 die beste Pollenfertilität auf. Dies könnte zusätzlich darauf hinweisen, dass es sich um Rückkreuzungen zu Deutschem Weidelgras handelte. Es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den definierten F₂ (FEL×FEL) aus Pflanzung Nr. 164, deren Elternpflanzen in Weizenisolationen abblühten und den Pflanzen aus Nr. 163 (Abbildung 1).

Betrachtete man den Samen-ertrag, der als Schätzer für die weibliche Fertilität der Pflanzen dienen sollte, so zeigte sich, dass dieser stark standortabhängig war. Eine Pflanzung war stark von Mutterkorn befallen, zwei Pflanzungen befanden sich an einem Standort, wo vermutlich nicht genug Pollen von Weidelgras oder Wiesenschwingel zur Verfügung stand. Die Pflanzungen am Standort Labor lieferten einen signifikant geringeren Samen-ertrag als die Pflanzungen in Pulling. Bei der Auswertung der anderen F₁ Pflanzungen stellte sich heraus, dass innerhalb des Kreuzungserfolgs 2009 die NK Orleans einen signifikant höheren Samen-ertrag lieferten. Innerhalb des Kreuzungserfolgs 2007 zeigte die Nachkommenschaft von Gladio im Vergleich zur Nachkommenschaft von Lipreso ebenfalls ein höheres Niveau. Bei den F₂ Pflanzungen konnten aufgrund hoher Variabilität keine signifikanten Unterschiede zwischen den Nachkommen-schaften gezeigt werden. Die F₂ Pflanzung Nr. 163 wies einen signifikant höheren Samen-ertrag auf als die F₁ Pflanzungen, die F₂ Pflanzung Nr. 164 und die Pflanzen aus Rückkreuzung zu Wiesenschwingel (Nr. 1871). Pflanzung Nr. 164 unterschied

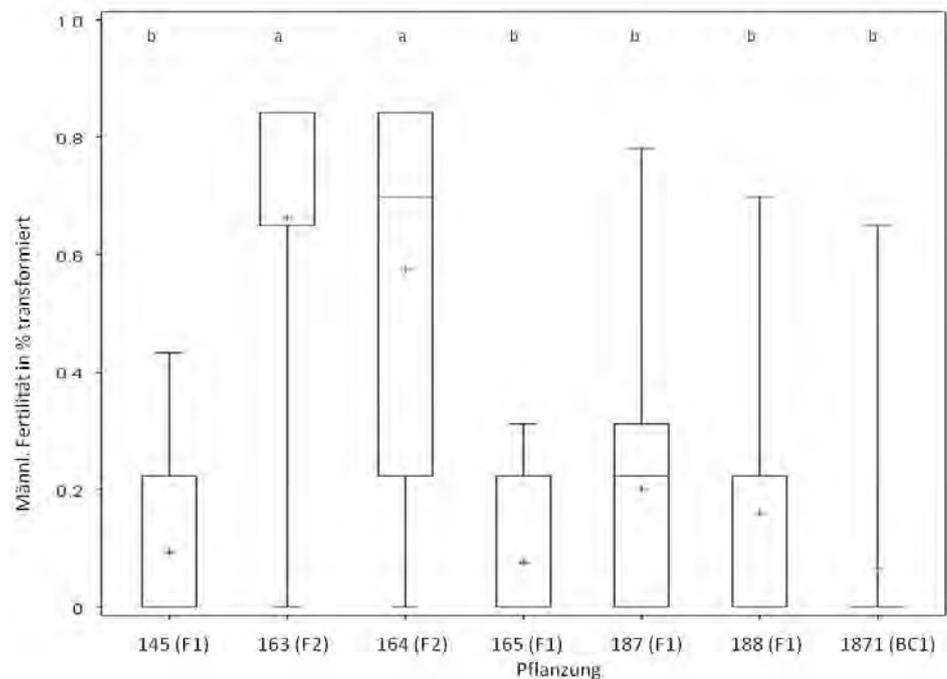


Abbildung 1: Männliche Fertilität der Pflanzen aufgeteilt nach Pflanzungen (Kreuzungsjahren). Bei 145, 165, 187 und 188 handelt es sich um F₁ Pflanzungen (Lp×Fp); 163 = FEL×?; 164 = FEL×FEL; 1871 = FEL×Fp (Gleiche Buchstaben weisen auf keine signifikanten Unterschiede hin)

Figure 1: Male fertility (%) of plants of different plantings (crossing years). 145, 165, 187 and 188 are F₁ plants (Lp×Fp); 163 = FEL×?; 164 = FEL×FEL; 1871 = FEL×Fp (same letters indicate non significant differences)

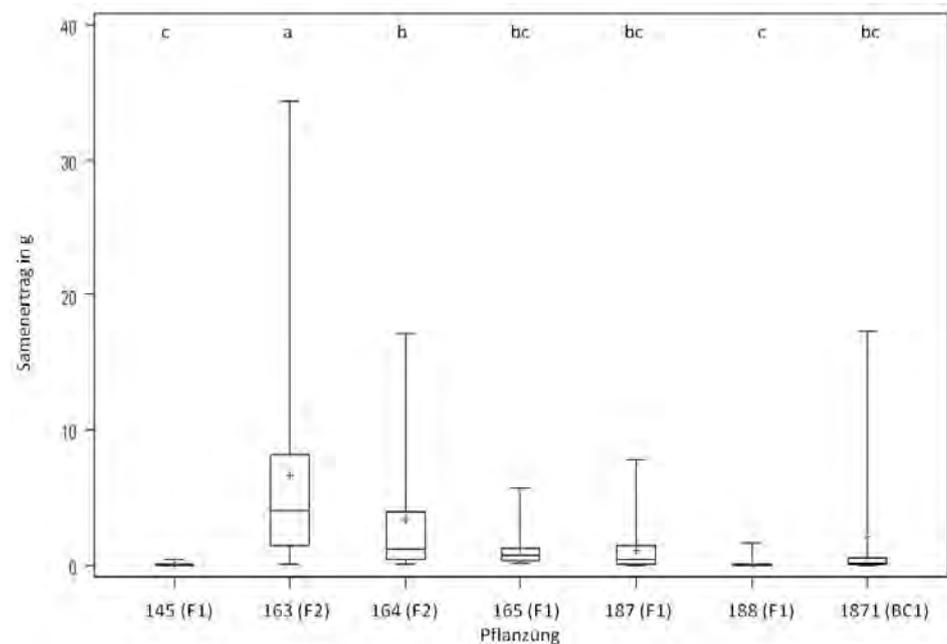


Abbildung 2: Samenertrag (g) pro Pflanze aufgeteilt nach Pflanzungen (Kreuzungsjahren). Bei 145, 165, 187 und 188 handelt es sich um F₁ Pflanzungen (Lp×Fp); 163 und 164 sind BC₁ Lp oder F₂; 1871 sind BC₁ Fp (Gleiche Buchstaben verweisen auf nicht signifikante Unterschiede)

Figure 2: Seed yield (g) per plant of different plantings (crossing years). 145, 165, 187 and 188 are F₁ plants (Lp×Fp); 163 and 164 are BC₁ Lp or F₂; 1871 are BC₁ Fp (same letters indicate non significant differences)

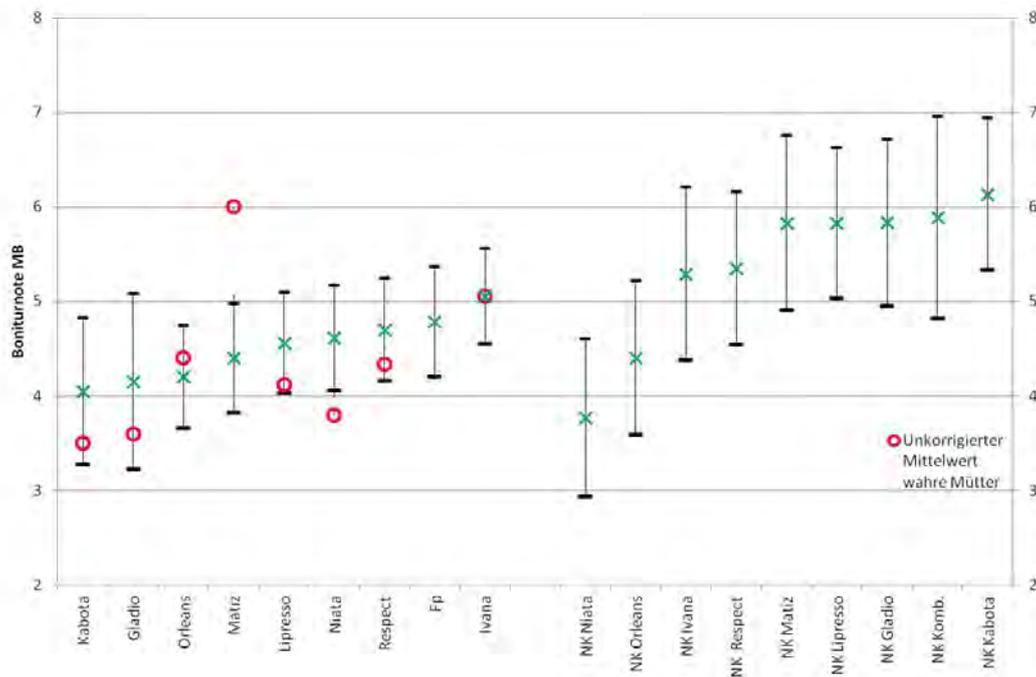


Abbildung 3: Mittelwerte aller Boniturnote Massenbildung. Vergleich der Nachkommenschaften innerhalb eines Kreuzungsjahres (Mittelwerte mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant verschieden)

Figure 3: Mean score values for biomass growth. Comparison of progenies within the same crossing year (Mean values with the same letter are not significant different)

sich signifikant von den F_1 Pflanzungen, die am Standort Labor beerntet wurden (Nr. 145a, Nr. 188) (Abbildung 2).

Merkmalsbonituren

Mit der SAS Prozedur MIXED wurden die einzelnen Boniturnoten für Massenbildung über Nutzungsjahre und Standorte verrechnet. Die Unterschiede zwischen den Nachkommen sind in *Abbildung 3* dargestellt. Das gleiche Verfahren wurde zum Vergleich der Elternsorten verwendet. Signifikante Unterschiede waren hier nicht erkennbar. Im Ranking der Elternsorten wies die Sorte Ivana den höchsten Mittelwert bezüglich der Bonitur Massenbildung auf. Die Nachkommen der Sorten Respect, Ivana, Niata und Orleans wurden am schlechtesten bewertet. Beim Vergleich innerhalb von Pflanzungen, bei dem das Alter der Pflanzen als Einflussfaktor vernachlässigt werden konnte, bestätigte sich die Rangfolge des eingesetzten Elternmaterials im Kreuzungserfolg der Jahre 2007 und 2009. Nachkommen von Niata, die auch im Kreuzungsjahr 2010 entstanden, waren ebenfalls leistungsschwächer als die Vergleichsnachkommenschaften. In den Jahren 2009 und 2010 wurden identische Mutterpflanzen verwendet.

Aufgrund der großen Variabilität und einer zu kleinen Datenmenge konnten Signifikanzen weder beim Vergleich der Nachkommenschaften untereinander noch der Eltern nachgewiesen werden. Durch die aufsteigende Sortierung der Mittelwerte lassen sich aber zumindest Tendenzen erkennen.

Die Nachkommen der Sorten Ivana, Niata und Respect zeigten geringere Ausprägungen bei den beobachteten Merkmalen als die Elternsorte. Bei den Nachkommen der Sorten Kabota und Gladio wurden hingegen höhere Aus-

prägungen als bei den Eltern verzeichnet. Die restlichen Nachkommenschaften blieben gegenüber ihren Elternpopulationen konstant. Bei der Betrachtung der verschiedenen Kreuzungsjahre wurden aus dem Kreuzungsjahr 2007 die NK Kabota, aus dem Kreuzungsjahr 2008, die NK Gladio, aus dem Kreuzungsjahr 2009 die NK Lipresso und aus dem Kreuzungsjahr 2010 die NK Matiz mit den höchsten Bonituren für Massenbildung bewertet.

Beim Merkmal Dichtigkeit wurde bei der Auswertung vorgegangen wie beim Merkmal Massenbildung. Die Nachkommenschaften und die Elternsorten bzw. -populationen wurden jeweils untereinander verglichen (Abbildung 4). Bei beiden Auswertungen zeigten sich beim gewählten Signifikanzniveau keine Unterschiede. Die Wiesenschwingelpopulation wies einen höheren Mittelwert für Dichtigkeit auf als die Sorte Gladio. Da nur eine einzige Pflanze der Sorte Gladio auf der Beobachtungsfläche stand, ist zu berücksichtigen, dass der Vergleich sich nur auf diese beziehen kann. Der nicht korrigierte Mittelwert der wahren Mutterpflanzen war relativ konstant mit den korrigierten Mittelwerten der Sorten.

Bei den Nachkommenschaften der Sorten Gladio, Matiz, Lipresso und Kabota wurden höhere Ausprägungsstufen erfasst als bei den Weidelgras-Eltern. Der Nachkomme des Kombinationsklons konnte nicht mit seiner Mutterpflanze verglichen werden, da letztere ausgefallen war. Die Nachkommen von Orleans, Respect und Niata konnten beim Merkmal Dichtigkeit die Boniturnoten ihrer maternalen Elternpopulationen nicht erreichen. Bei der Kreuzung mit Wiesenschwingel wäre im Grunde eine Abnahme des Merkmals Dichtigkeit bei allen Nachkommen zu erwarten gewesen.

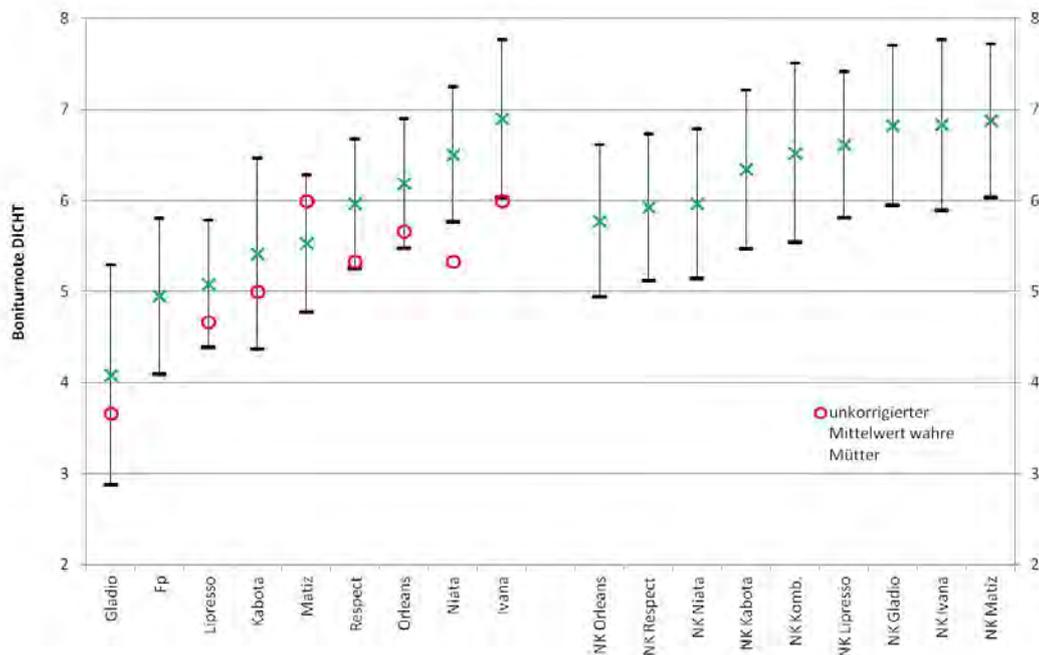


Abbildung 4: Vergleich der Elternsorten (rechts) und ihrer Nachkommenschaften (links) bezüglich des Merkmals Dichtigkeit
 Figure 4: Comparison of parental genotypes (right) and their progenies (left) in regard to density

Diese blieb jedoch bis auf die bereits erwähnten Populationen auf dem ursprünglichen Niveau erhalten.

In den meisten Fällen waren Mutterpflanzen und Nachkommenschaften in verschiedenen Jahren gepflanzt worden und hatten somit ein unterschiedliches Alter. Die Nachkommenschaften hatten ebenfalls nicht das gleiche Alter. Das Alter der Pflanzen hat jedoch in der Regel Auswirkung auf dessen Größe und dadurch auch auf andere Merkmale. Um die Sorten bzw. die Nachkommenschaften vergleichbar zu machen, wurden jeweils nur Muttersorten und Nachkommenschaften untereinander verglichen. Die Muttersorten bzw. -pflanzen hatten einen Altersunterschied von max. 2 Jahren. Die meisten Pflanzen der Elternsorten wurden in den Jahren 2009 und 2010 gepflanzt. Bonituren wurden nur im Jahr 2011 durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurden die F_1 und F_2 Pflanzen in mehreren aufeinander folgenden Jahre in unterschiedlicher Häufigkeit bonitiert. In diesem Fall wurden im Rahmen der statistischen Verrechnung die Boniturnote je nach Alter der Pflanzen korrigiert.

Bei Hinzunahme der Elternpopulationen war dies aufgrund zu vieler fehlender Datensätze nicht möglich. Deshalb wurden Muttersorten und Nachkommenschaften getrennt verglichen und Veränderungen der Rangfolge interpretiert. Da es sich bei den Muttersorten aber um sehr weit streuende Populationen handelte, von denen nur einzelne Individuen als Elternpflanzen selektiert worden waren, musste die Qualität der Mutterpflanze innerhalb der Population ebenfalls berücksichtigt werden. Dennoch wurden zumindest Tendenzen erkennbar. Die gleichen Probleme traten bei der Bonitur Dichtigkeit auf und wurden analog gelöst. Bezüglich Massenbildung erhielt die Sorte Ivana den besten Mittelwert. Trotz der guten Qualität der tatsächlich verwendeten, also wahren Mutterpflanze, die im Mittel der Sorte lag, konnte diese Eigenschaft nicht an die Nachkommenschaft weiter

gegeben werden. Diese schnitt im Vergleich zu anderen Nachkommenschaften verhältnismäßig schlecht ab. Für die Kreuzungen mit der Sorte Matiz wurde eine Mutterpflanze mit hoher Ausprägungsstufe ausgewählt, was die Dominanz der Nachkommenschaften erklärte. Allerdings ist es möglich, dass hier das Modell nicht genug Daten für eine Auswertung zur Verfügung hatte, weil sowohl die Population der Muttersorte Matiz sowie deren Nachkommen, die im Kreuzungsjahr 2010 entstanden, vergleichsweise jung waren. Die Mutterpflanzen aus den Sorten Niata und Respect lagen im Mittel unter dem Durchschnitt der Sortenleistung. Diese Mittelwerte wurden aber nicht durch die SAS Prozedur MIXED korrigiert, enthielten also nur den einfachen Durchschnitt der vorhandenen Mutterpflanzen. Im Besonderen war diese Korrektur durch das SAS Programm bei der Sorte Kabota und Gladio erkennbar. Von diesen befanden sich außer den wahren Mutterpflanzen keine anderen Genotypen der Sorten auf der Beobachtungsfläche. Das Statistikprogramm korrigierte die Werte also nach oben hin. Die wahre Mutterpflanze Matiz wurde dagegen in der Bewertung nach unten gestuft. Dadurch wurde die Rangfolge, die sich bei den Nachkommen durch die SAS Prozedur ergab, relativ gut haltbar. Die Wiesenschwingel Population auf der Beobachtungsfläche wurde relativ gut bewertet. Dies lag vermutlich daran, dass in der direkten Nachbarschaft dieser Population keine Deutschen Weidelgräser zum Vergleich standen. Die Deutschen Weidelgras Sorten wurden direkt nebeneinander angebaut und waren somit einfacher zu vergleichen. Bei der Betrachtung der einzelnen Kreuzungsjahre fiel auf, dass sich die Bewertung der NK Lipresso von Kreuzungsjahr 2007 zu 2008 stark änderten. Es ist zu vermuten, dass für die Vererbung des Merkmals Massenbildung der Einfluss des einzelnen Genotyps generell höher zu bewerten ist, als der Einfluss der Sorte aus dem dieser stammt.

Um die Elternpopulationen mit den Nachkommenschaften zu vergleichen, wurde nur die Bonitur Ährenschieben des Jahres 2011 und von diesen nur die Werte vom Standort Labor herangezogen.

Insgesamt begann die Wiesenschwingelpopulation früher mit dem Rispschieben als die Weidelgräser. Ausnahme waren die Sorten Ivana, Lipresso und Gladio, deren Ährenschieben noch früher war. Der Kombinationsklon, der 2008 für Kreuzungen verwendet wurde, war vermutlich auch ein früherer Typ als Wiesenschwingel. Die Häufigkeitsverteilungen der NK Orleans und NK Lipresso lagen zwischen den Elternpopulationen und waren von beiden signifikant verschieden. Die NK Respect begannen das Ährenschieben später als die Sorte Respect. Die Nachkommen unterschieden sich signifikant von beiden Elternpopulationen. Die NK Niata lagen ebenfalls zwischen Wiesenschwingel und der Sorte Niata, unterschieden sich aber von letzterer nicht signifikant. Gleiches galt für die NK Kabota. Die NK Ivana unterschieden sich dagegen nicht von der Wiesenschwingelpopulation. Die Sorte Ivana begann signifikant früher mit dem Ährenschieben. Fp, die Gladio Mutterpflanze und NK Gladio waren signifikant verschieden. Die NK des Kombinationsklons begann signifikant früher mit dem Ährenschieben als die Wiesenschwingelpflanzen.

Bezüglich Rost wiesen die NK Respect einen signifikant höheren Rostbefall auf als alle anderen NK. Grund hierfür war die Verwendung einer rostanfälligen Mutterpflanze. Es konnte beobachtet werden, dass die Nachkommen sowohl höhere als auch niedrigere Noten erhielten als die Mutterpflanzen. Durch Rekombination und das Einkreuzen des Wiesenschwingels entstanden somit nicht nur resistentere Pflanzen sondern auch Genkombinationen, die einen Befall begünstigten. Ähnliche Beobachtungen konnten bei den NK Matiz, NK Ivana und NK Lipresso gemacht werden.

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die in der Literatur vorhandenen Erfahrungswerte konnten in der vorliegenden praktischen Arbeit weitgehend bestätigt werden. Die Rückkreuzung mit Wiesenschwingel hatte weniger Erfolg als die Rückkreuzung mit Deutschem Weidelgras. Diesen Hinweis lieferten vor allem die GISH Analysen. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs der BC₁ Fp war die geringe Fertilität dieser Züchtungsgeneration zwar ein Hinweis, aber kein aussagekräftiges Ergebnis. Die BC₁ Fp Pflanzen werden somit in weiteren Züchtungsschritten mit Ausnahmen nur als Mutterpflanzen verwendet werden können. Ebenso verhielt es sich mit dem Verlust an Festuca Chromatin in den BC Generationen. Die cytologischen Vorgänge schienen in di- und polyploiden *Festulolium* Pflanzen weitgehend gleich zu sein. Insgesamt ist bei der Bewertung der Ergebnisse der z.T. geringe Stichprobenumfang als problematisch anzusehen.

Durch die nicht vorhandene Randomisation konnten Randeffekte sowie Effekte, die durch das leichte Gefälle am Standort Labor entstanden, nicht als Umwelteffekte in der statistischen Analyse identifiziert werden. Um eine Verrechnung möglich zu machen, mussten die Einflüsse der Rand- und Umwelteffekte an den Standorten vernachlässigt werden. Für die Interpretation der Ergebnisse durften

Umwelteffekte innerhalb eines Standorts aber nicht außer Acht gelassen werden. Vor allem wurden die Bonituren Ährenschieben, Massenbildung und Dichtigkeit davon beeinflusst. Durch das Gefälle verfügten manche Pflanzen über eine bessere Wasser- und Nährstoffversorgung, was vor allem in dem sehr trockenen Frühjahr einen starken Einfluss hatte. Da die Reihenfolge der Pflanzen am Standort Pulling dieselbe war, befanden sich auch dort fast immer die gleichen Pflanzen am Rand. Hinzu kam, dass letzterer Standort sehr weitläufig war und noch größere Effekte zwischen den Pflanzungen an diesem Standort als zwischen den Pflanzungen am Standort Labor zu erwarten gewesen wären.

Insgesamt wurden die NK Kabota und NK Gladio als sehr gute Nachkommenschaften bewertet. Leider handelte es sich dabei um sehr kleine Familien. NK Kabota umfasste vier Pflanzen, während die NK Gladio nur aus einer Pflanze bestand. Die Mutterpflanzen wurden nicht als Sorten angebaut, sondern es befanden sich nur die jeweils verwendeten Mutterpflanzen als Individuen unter Beobachtung. Teilweise waren auch die Mutterpflanzen nicht mehr existent, wie bei den ersten NK Ivana und den NK Komb., die in den meisten Auswertungen vernachlässigt wurden. Da die Elternpflanzen nur bei der direkten Auswahl für den Kreuzungsvorgang bewertet worden waren, befanden sich auch qualitativ und quantitativ nicht so hochwertige Pflanzen darunter.

Interessant wird im folgenden Jahr die Frage sein, ob die Festulolii, deren Mutterpflanze Wiesenschwingel war, leichter mit Wiesenschwingel rückkreuzbar sind und sich die Fertilität wiederherstellt. Inzwischen besteht die F₁ Population aus 617 Einzelpflanzen und die BC₁ Population aus 106 Einzelpflanzen. Aus kleinen Anfängen ist in diesem Bereich also Material und Erfahrung gewachsen, das vor einem nächsten Entwicklungsschritt gesichtet und bewertet wurde. Die bisherigen Ergebnisse wiesen auf eine hohe Variabilität hin. Es wurden F₁ Pflanzen für Kreuzungen im nächsten Jahr zusammengestellt, die im Freiland von einem ausgewählten Wiesenschwingel-Genotyp befruchtet werden sollen. Hierzu wurden diese F₁ Pflanzen von einem Mantel einer sehr stark verklonten Einzelpflanze umgeben.

Alle F₁ Pflanzen befanden sich seit Herbst 2011 in einer Klonbeobachtung und können in den nächsten Jahren unabhängig vom Kreuzungsjahr in einer Anlage inkl. Elternstandards verglichen werden.

Die Verifizierung der Festulolii wäre mit der GISH Methode am einfachsten. Eine zusätzliche Analyse mit codominanten Markern würde zusätzliche Informationen liefern. Die Interpretation der Marker wäre aufgrund der GISH Daten einfacher und haltbarer. Im Zuge dieser Methode würde zusätzlich der Ploidiegrad der Pflanzen geklärt und aneuploide Organismen könnten von weiteren Züchtungsschritten ausgeschlossen werden. Triploide Pflanzen, die als F₃ zu erwarten sind, könnten mit Colchizin aufgedoppelt und in einem getrennten Zuchtgang bearbeitet werden. Die Fragestellungen, die der vorliegenden Arbeit zu Grunde lagen, konnten nur teilweise beantwortet werden. Die Kombinationfähigkeit in Bezug auf die Kreuzung ist vermutlich nicht nur vom Genotyp abhängig, sondern auch stark von der Handhabung während des Kreuzungsvorgangs. Um die Frage zu klären, inwieweit die Kombinationsfähigkeit

von Gattungen, Sorten oder einzelnen Genotypen abhängt, müssten umfassendere Kreuzungsversuche angelegt werden, bei denen einzelne *Lp* Genotypen mit einzelnen *Fp* Genotypen wiederholt gekreuzt werden. Verluste während des Kreuzens dürften aufgrund ausreichender Anzahl an Wiederholungen nicht ins Gewicht fallen. Bei den F_2 und BC Generationen lässt sich jedoch die Aussage treffen, dass Deutsches Weidelgras im Allgemeinen für weitere Züchtungsschritte erfolgreicher wäre. Bei der reziproken F_1 Kreuzung ($Fp \times Lp$) muss erst die Qualität der Nachkommen im Feld bewertet werden.

Die bewerteten Merkmale wurden je nach Mutterpflanze unterschiedlich vererbt. Bei Krankheiten war dies stark von den Einzelpflanzen abhängig. Im Allgemeinen lagen die F_1 Populationen im Mittel der Elternpopulationen, wobei die Einzelpflanze nicht immer den stärksten Einfluss hatte. Allerdings waren die Umwelteffekte schwer abzuschätzen. Die Fertilität kann durch Kreuzung der Hybriden sowohl mit anderen Hybriden als auch mit Kreuzungen mit *Lp* restauriert werden. Die Anzahl $BC_1 Fp$ Pflanzen war noch nicht ausreichend hoch, um eindeutige Aussagen zu treffen. Bei allen Hybriden war eine große Spannweite zu beobachten. Es befanden sich auch Einzelpflanzen unter den $FEL \times FEL$ und $FEL \times ?$ Hybriden, die vollkommen steril waren. Die weibliche Fertilität war stark standortabhängig, wobei eine Korrelation von 0,45 zwischen männlicher und weiblicher Fertilität errechnet wurde. Bei den $BC_1 Fp$ Pflanzen, die bonitiert werden konnten, wurde nur bei einer Pflanze eine zufriedenstellende männliche Fertilität beobachtet.

Der bearbeitete Zuchtgang befindet sich noch in der Anfangsphase des Zuchtprogramms in der Erstellung von Ausgangspopulationen. Die Ergebnisse zeigen den noch weiten Weg von der beobachteten vergrößerten Variabilität bis zur angestrebten verbesserten Wiesenschwingel Sorte. Die bisherigen Beobachtungen zeigen jedoch das Potenzial, das schon in den vorliegenden Kreuzungen steckt.

Danksagung

Gedankt sei Leoni Forster (IPZ 4b) für technische Assistenz bei den Kreuzungen, Dr. Stefan Seefelder (IPZ 5c) und Dr. David Kopecký (Institute of Experimental Botany, Olomouc) für die Durchführung der genetischen Analysen, Herrn Eckl (ABV VB) für die Hilfe bei der statistischen Verrechnung, Frau Gellan (IPZ 1c) und Herrn Baumann (IPZ 1a) für die Hilfe beim Aufbau des Hydropony und der Evaluierung der Pollenfertilität, sowie Prof. Dr. Martin Elsässer und Dr. Ulrich Thumm (Universität Hohenheim) für wissenschaftliche Betreuung.

Literatur

- BSA, 2000: Richtlinien für die Durchführung von landwirtschaftlichen Wertprüfungen und Sortenversuchen. Bundessortenamt, Hannover. [Internet: http://www.bundessortenamt.de/internet30/fileadmin/Files/PDF/Richtlinie_LW2000.pdf; verifiziert 13 Feb 2012].
- BSA, 2009: Beschreibende Sortenliste, Futtergräser, Esparssette, Klee, Luzerne. Bundessortenamt, Hannover. [Internet: http://www.bundessortenamt.de/internet30/fileadmin/Files/PDF/bsl_futtergraeser_2009.pdf; verifiziert 13 Feb 2012].
- GYMER P, WHITTINGTON W, 1973: Hybrids between *Lolium perenne* L. and *Festuca pratensis* Huds. *New Phytol* 72: 411-424.
- HEINZ S, KUHN, G, 2008: 20 Jahre Bodendauerbeobachtung in Bayern, Teil 2: Vegetation auf Äckern und Grünland. LfL-Schriftenreihe 5/2008. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising-Weihenstephan.
- UPOV, 2002: Allgemeine Einführung zur Prüfung auf Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit und Erarbeitung harmonisierter Beschreibungen von neuen Pflanzensorten. Internationaler Verband zum Schutz von Pflanzenzüchtungen, Genf. [Internet: http://www.upov.int/de/publications/tg-rom/tg001/tg_1_3.pdf; verifiziert 13 Feb 2012]
- VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, REIJANS M, VAN DE LEE T, 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acid Res* 23: 4407-4414.

Anmerkung: Die Online-Version des Tagungsbandes enthält alle Abbildungen in Farbe und kann über die Homepage der Jahrestagung (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/>) - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchertagung - Saatzüchertagung 2011) oder den korrespondierenden Autor bezogen werden.

Root characteristics of durum wheat and wheat relatives

Alireza Nakhforoosh, Doris Schuhwerk, Gernot Bodner,
Stefan Kutschka and Heinrich Grausgruber^{1*}

Abstract

Access to a rich genetic diversity, and easy and feasible screening methods are main prerequisites for an efficient breeding program. Under drought condition, roots could play an outstanding role to improve yield by effective absorption of water from soil. Since roots are not easily accessible, root characteristics are hardly exploited in crop breeding so far. In the present study the diversity of root properties of 7 durum wheat genotypes and 5 relatives was determined in 3 soil depths, i.e. 10-20, 30-40 and 50-60 cm, of a field trial. As an easy and non-destructive field screening method in regard to root system size, electrical capacitance was assessed for its efficiency to predict 'true' root characteristics. The results revealed significant differences between genotypes and soil depths. A significant and positive correlation between root capacitance and/or root length and root surface indicates the capability of this method for the screening of genetic material under field conditions.

Keywords

Einkorn wheat, Khorasan wheat, root image analysis, *Triticum durum*, *T. timopheevi*

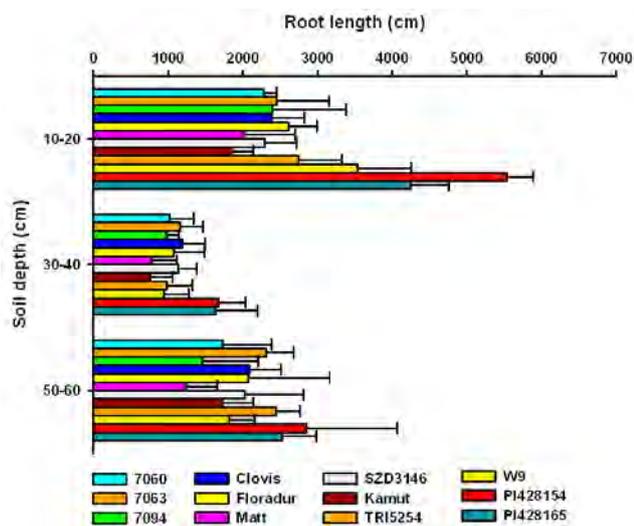


Figure 1: Root length of different wheat material in three soil depths (mean values + standard deviations)

Introduction

Improving abiotic stress resistance is a major challenge for plant breeding. Especially drought is among the most important environmental constraints to plant growth. LEVITT (1980) identified three main responses to water stress in natural plant communities: (i) drought escape, (ii) dehydration tolerance and (iii) dehydration avoidance. Dehydration avoidance may be achieved by reduced losses ('water savers') and improved supply ('water spenders'). Although the plant root system is essential to ensure an efficient water uptake (BLUM 2009), it is still hardly exploited in plant breeding (PALTA et al. 2011). A targeted integration of the root system into plant breeding requires knowledge on the existing diversity in root traits. The objective of the current study was to assess root system properties in different durum wheat genotypes and selected accessions of relatives. The main distinguishing features of root system diversity within this nursery are presented.

Material and methods

Plant material

Seven durum wheat (*Triticum durum*) genotypes, i.e. 7060 (CDSS02Y01022T-0TOPB-0Y-0M-21Y-0Y), 7063 (CDSS02Y01082T-0TOPB-0Y-0M-11Y-0Y), 7094 (CDSS02B00667S-0Y-0M-10Y-4M-04Y-0B), Clovis, Floradur, Matt and SZD3146, two Khorasan wheat (*T. turanicum*), i.e. QK-77 (Kamut[®]) and TRI5254, two einkorn wheat (*T. monococcum*), i.e. PI428154 and PI428165, and one Zanduri wheat (*T. timopheevi*), i.e. W9, were tested in a field experiment with 4 replications. The field trial was sown on 8 March 2011 in Raasdorf (16°35'E, 48°14'N) in the Pannonian plains growing region of Eastern Austria. Plot size was 1.75 m² (1.4×1.25 m).

Trait measurements

Electrical capacitance was measured by an Escort elc-133 lcr-meter (CHLOUPEK 1977) at the physiological stages stem elongation, inflorescence emergence and development of fruit. Thereby, an estimation of root system size was obtained. On 16 June (milk dough stage) the roots were sampled from 3 soil depths (10-20, 30-40 and 50-60 cm) by means of a single root auger from the center of each plot. Samples were stored at -20°C until final processing. After

¹ University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Department of Crop Sciences, Division of Plant Breeding, Konrad Lorenzstraße 24, A-3430 TULLN

* Ansprechpartner: Heinrich GRAUSGRUBER, heinrich.grausgruber@boku.ac.at

storage the samples were defrosted at room temperature. Then the roots were washed and sieved (pore size 0.63 mm). To prepare the roots for scanning they were coloured by an azur eosin methylene-blue solution (1:20 v/v). After staining the roots were scanned by a flat bed scanner and analyzed by winRhizo software (Regent Instruments Inc., Québec City). Measured root parameters included root length, root diameter, root surface and root volume. To measure root dry matter the roots were dried at 60°C and weighted after 24 h.

Results and discussion

This study revealed significant differences between genotypes and different soil depths for all investigated root characteristics. Root length varied from 4049.6 cm (durum cv. Matt) to 10065.3 cm (einkorn PI428154) with an average of 6004.3 cm. All genotypes showed their maximum and minimum root length in the upper and intermediate soil layer, respectively (*Figure 1*). The einkorn wheat accessions showed a significantly higher root length in all three soil depths compared to the other genotypes.

Concerning root surface area an average value of 774.0 cm² was estimated; with a minimum of 502.6 cm² for durum cv. Matt and a maximum of 1123.0 cm² for einkorn accession PI4281154. Root diameter varied between 0.368 mm (PI4281154) and 0.455 mm (Clovis). *Figure 2* shows a part of the observed root diameter diversity. In regard to root volume, minimum and maximum values were obtained for Matt (5.15 cm³) and PI4281154 (10.12 cm³), respectively. Root dry matter varied significantly between 440.4 mg (Matt) and 912.6 mg (Floradur) with an average of 623.3 mg.

As it is shown in *Figure 3* a significant correlation between electrical capacitance and root length was obtained ($P \leq 0.0001$). Moreover, similar correlations were observed between electrical capacitance and root surface and root diameter, respectively ($P \leq 0.0001$). Since electrical capacitance is an easy and non-destructive measurement it could be suggested as a feasible method for screening of genetic material for root system size under field conditions. In cereals the methodology was successfully deployed to study root system size of oats (CHLOUPEK 1972, 1977), the effect of semi-dwarf genes on root system size of barley (CHLOUPEK et al. 2006), to select barley for drought tolerance (CHLOUPEK et al. 2010), and recently to study the diversity in water use efficiency of wheat varieties (STREDA et al. 2012). Drawbacks of the method is the lack of knowledge concerning the electrical circuit of the system. Values are

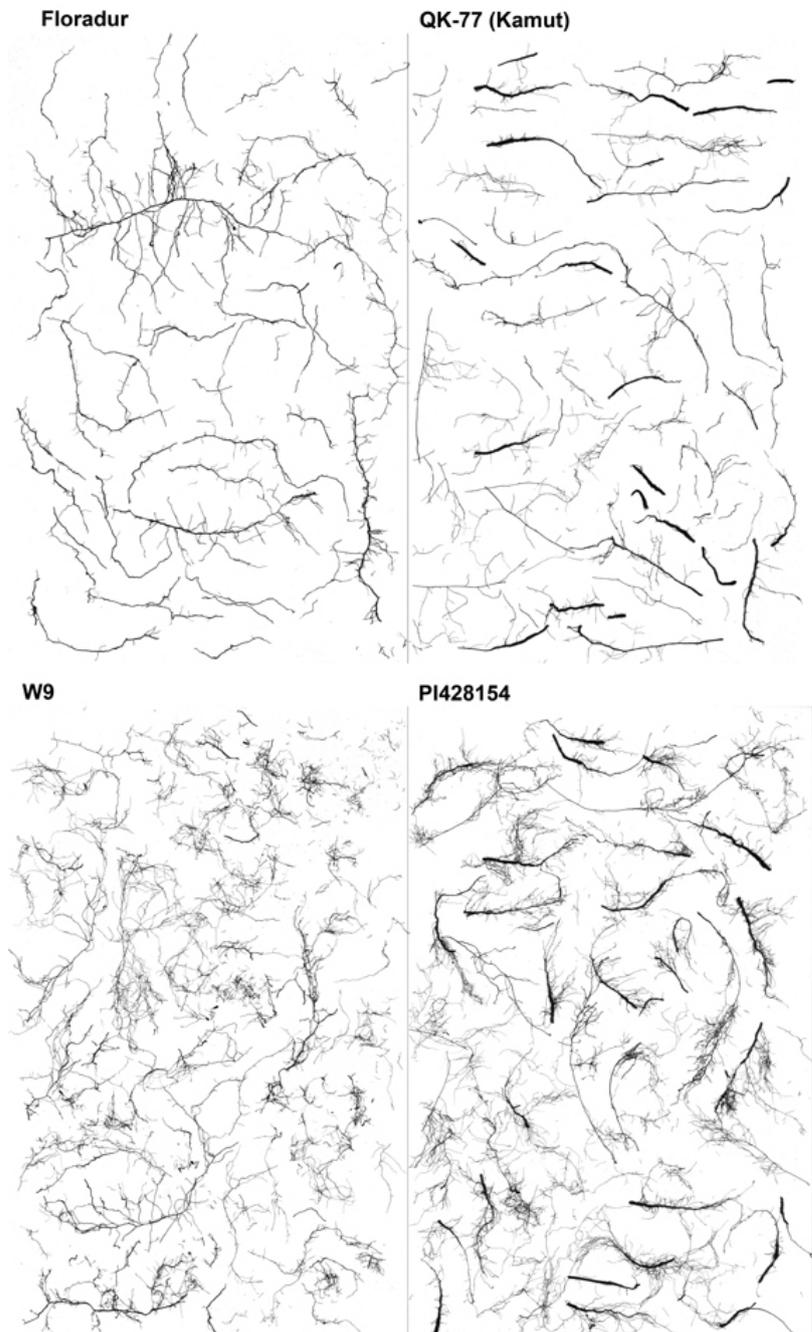


Figure 2: Scanned roots from 10-20 cm soil depth for Floradur (*T. durum*), Kamut (*T. turanicum*), W9 (*T. timopheevii*) and PI428154 (*T. monococcum*)

only comparable for plants of the same species grown in the same substrate, at the same soil moisture (a moist medium around the plant root system is necessary) and measured at the same time. The measured aerial parts must be dry (no precipitation immediately before or during measurements), dry leaves at the basal stems have to be removed, the electrode must be consistently placed (CHLOUPEK et al. 2006), and development stages have to be considered in the analysis. To summarize, this study confirmed a considerable variation concerning the investigated root properties and also the capability of electrical root capacitance measurements as

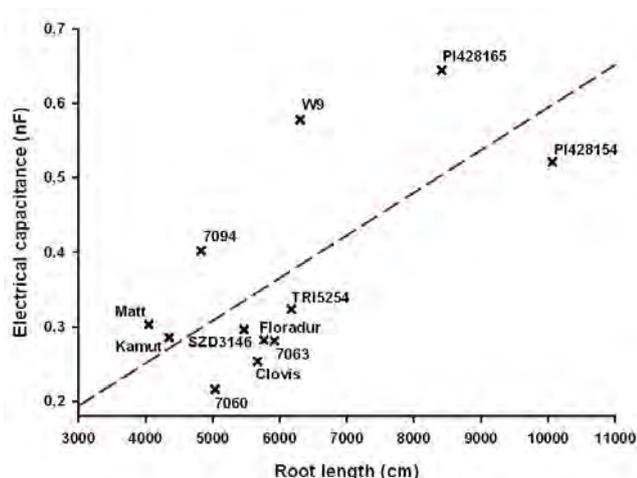


Figure 3: Relationship between root length and electrical capacitance (measured at milk dough stage on 17 June) for different wheat material

an easy and feasible method for the screening of genetic material under field conditions. Further experiments with non-destructive methods for studying root architecture are necessary to better understand the differences between the studied genotypes.

Acknowledgements

The genebank curators H.E. Bockelman (USDA-ARS, Aberdeen), A. Graner (IPK, Gatersleben), T. Payne (CIM-

MYT, Mexico) and J. Lafferty (SZD, Probstdorf) are kindly acknowledged for providing the original seeds of the tested genotypes.

References

- BLUMA, 2009: Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crop Res* 112: 119-123.
- CHLOUPEK O, 1972: The relationship between electric capacitance and some other parameters of plant roots. *Biol Plant* 14: 227-230.
- CHLOUPEK O, 1977: Evaluation of the size of a plant's root system using electrical capacitance. *Plant Soil* 48: 525-535.
- CHLOUPEK O, FORSTER B, THOMAS W, 2006: The effect of semi-dwarf genes on root system size in field-grown barley. *Theor Appl Genet* 112: 779-786.
- CHLOUPEK O, DOSTAL V, STREDA T, PSOTA V, DVORACKOVA O, 2010: Drought tolerance of barley varieties in relation to their root system size. *Plant Breed* 129: 630-636.
- LEVITT J, 1980: Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York.
- PALTA JA, CHEN W, MILROY SP, REBETZKE GJ, DRECCER MF, WATT M, 2011: Large root systems: are they useful in adapting wheat to dry environments? *Funct Plant Biol* 38: 347-354.
- STREDA T, DOSTAL V, HORAKOVA V, CHLOUPEK O, 2012: Effective use of water by wheat varieties with different root system sizes in rain-fed experiments in Central Europe. *Agric Water Manage* 104: 203-209.

Note: The online version of the proceedings includes all figures in colour. It can be downloaded either from the homepage of the meeting (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/>) - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchertagung - Saatzüchertagung 2011) or requested from the corresponding author.

Biomass production of white mustard (*Sinapis alba* L.) varieties in relation to the root system size

Martin Hajzler^{1*}, Jana Klimešová and Tomáš Středa

Abstract

Root system size (RSS) of eight white mustard varieties was evaluated in a field trial. The two-year experiment was conducted on two different agro-ecological sites in the Czech Republic: Troubsko and Horní Třešňovec. RSS was measured during the vegetation period by the electrical capacity method. At the end of vegetation the above ground biomass and root samples were evaluated by digital image analysis. There was no statistically significant relationship between RSS and amount of aboveground biomass. Relationship between RSS and content of NO_3^- and NH_4^+ ions in the soil after harvest was observed. RSS negatively correlated with the content of nitrate nitrogen in the soil, however, the correlation was statistically not significant. Evaluation across sites revealed a positive correlation between aboveground biomass and amount of residual NO_3^- ions in the soil ($r=0.54$). On the other hand a significant negative correlation ($r=-0.81$) of RSS and NH_4^+ ions content was observed in Troubsko.

Keywords

Biomass, cover crops, electric capacity, nitrogen, root system, *Sinapis alba*

Introduction

An influence of plant species on nitrogen (N) management is obvious. The plants of the family *Brassicaceae* (*Cruciferae*) belong to high consumers of N for biomass production. They receive more N than cereals or legumes (SMUKALSKI et al. 1991). Although the root density of *Brassicaceae* is lower than e.g. *Poaceae*, their root system grows faster and achieves greater depths (MEISINGER et al. 1991). This allows access to a greater volume of soil and reduces N leaching (THORUP-KRISTENSEN 2001). BODNER et al. (2011) found a higher root biomass production of white mustard (*Sinapis alba* L.) compared to lacy phacelia, rye and vetch. The ability of mustard to immobilize N was evaluated by FRANCIS et al. (1998). Similarly, HERRERA and LIEDGENS (2009) compared mustard with other cover crops. White mustard in comparison with sunflower and lacy phacelia showed the smallest N loss by washing but was not absorbing most N from the soil. The reason may be its rapid initial growth. Flowering stage starts early, therefore, total N accumulation is lower and its retention time is shorter.

CONSTANTINE et al. (2010) studied the effect of long-term cultivation of mustard on N leaching and mineralization rate of residual N. The constant efficiency of mustard to prevent leaching of soil N was recorded in long-term (17 years) observations. However, only in the early years of the experiment, the influence on increasing the mineralization of N in the soil was registered.

Aims of this work were the following: (i) analysis of different N intake from the soil, aboveground biomass production and the root system size of eight white mustard varieties, (ii) to analyze whether plants with larger root system uptake more soil N, (iii) to determine the correlation between amount of aboveground biomass and the amount of residual N in the soil.

Material and methods

The experiment was conducted at two Czech locations in 2010 and 2011. The first location Horní Třešňovec is located in the foothills of Orlické hory mountains and represents less fertile soils with higher annual rainfall and lower average air temperature (temperate warm agroclimatological area; KURPELOVÁ et al. 1975). Soils are stagnosols with topsoil of 30 cm. The second location Troubsko is located in the fertile area near Brno in the warm and mainly dry agroclimatological area (KURPELOVÁ et al. 1975). Soils are fluvisols.

Eight varieties of white mustard, i.e. Medicus, Seco, Semper, Severka, Sito, Sirte, Veronika and Zlata were evaluated. Plants were planted in small plots experiment with four replications. At the beginning and end of the experiment soil samples were collected. The content of NO_3^- and NH_4^+ nitrogen was determined.

Root system size (RSS) was measured by two methods: electrical capacity (CHLOUPEK 1977) and digital image analysis. The first method is nondestructive and is performed directly in an environment where the plant grows (in situ). The measuring device operates with two electrodes, the cathode (forceps or needle) is attached to the stem of plants about 1 cm above soil surface. Anode (needle) is inserted into the soil at a distance of 10 cm from the studied plants. The electric current passes through the circuit at a frequency of 1 kHz. The measured values are given nF (nanofarad). The instrument measures the parallel capacity (Cp) in a similar way as capacitors. In this case, the capacitor plates is a root system and the substrate in which it grows. Measurements were performed by Voltcraft LCR 4080

¹ Mendel University, Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Zemědělská 1, CZ-613 00 BRNO

* Ansprechpartner: Martin HAJZLER, martin.hajzler@mendelu.cz

sensor in three growth stages (stem elongation, flowering and ripening). Ten plants of each variety in each replication were measured.

The second method is based on digital analysis of washed and scanned roots (STŘEDA et al. 2009). Sampling of soil with the root system was carried out at the end of the experiment in the growth phase of ripening. The sampling probe had a diameter of 63 mm and sampling was conducted to a soil depth of 60 cm. The obtained soil block was divided into 6 parts with a length of 10 cm, frozen at -20°C and stored for further processing. After thawing the block was floated through a system of sieves with mesh diameters of 1.6 and 0.6 mm. Captured roots were collected and subsequently scanned. The scanned image was processed in the program WinRhizo, Basic version (Régent Instruments Inc., Québec). This program evaluates among others the total length and surface roots. Scanned roots were then dried and weighed. The data was used for calculation of RLD (Root Length Density), RSD (Root Surface Density), which describe the length respectively area of roots per unit volume of soil. Furthermore, SRL (Specific Root Length), which evaluates the length of roots per gram root mass was evaluated. Aboveground biomass (dry weight) was determined at seed maturity (BBCH 70). The data were statistically processed with Statistica, Vers. 9 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK). Mean comparisons within analysis of variance was carried out by Fisher's LSD test ($\alpha=0.05$).

Results and discussion

RSS of single varieties on both localities in both years is displayed in *Figure 1*. Underdeveloped root system was observed in Třešňovec in 2010 which was most probably caused by extremely wet and rainy weather during the vegetation period. Thereby, the soil was wet for a considerable time and roots did not have enough air to evolve well. Varieties Medicus and Seco showed a smaller root system at both localities and years, whereas Semper showed a big root system in each environment which could be explained by a strong genetic effect. This fact is also shown in *Figure 2*, where the influence of locations and year on electrical capacity is illustrated. Mean comparisons from the analyses of variances are demonstrated in *Table 1*.

Further an influence of RSS on soil NO_3^- nitrogen consumption was observed. In Třešňovec in both years and in Troubsko in 2011 the varieties with higher RSS had a lower NO_3^- nitrogen balance in soil than varieties with larger root system. In Troubsko in 2010 a conclusive negative correlation between RSS and content of NH_4^+ ions in the soil ($r=-0.81^*$) was observed. Influence of RSS on biomass production was not statistically conclusive. Aboveground biomass showed an irresolute positive correlation to NO_3^- content in the soil at the end of vegetation period ($r=0.54$).

Using digital analysis SRL was determined, which is an important root system character and expresses the length of roots per unit of root system weight. Varieties with smaller

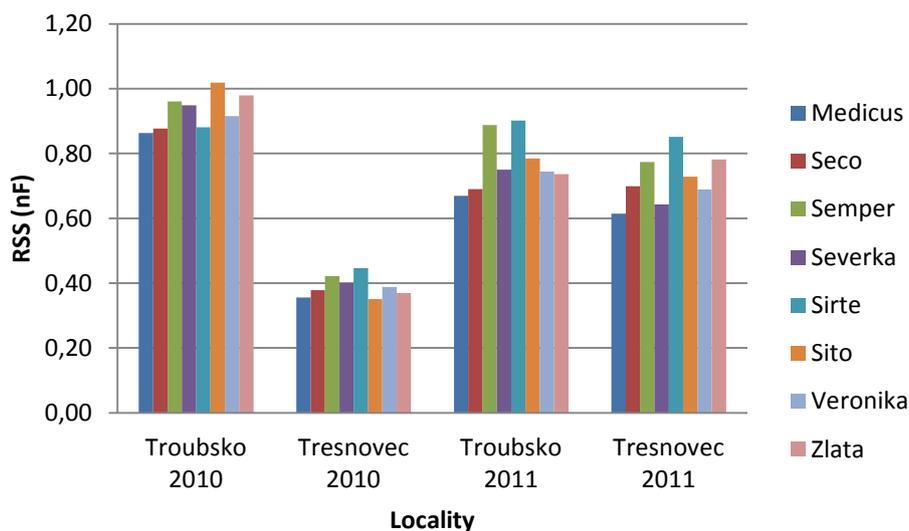


Figure 1: Genotypic variability of Root system size (RSS) in dependence of location and year (mean values from 3 measurements)

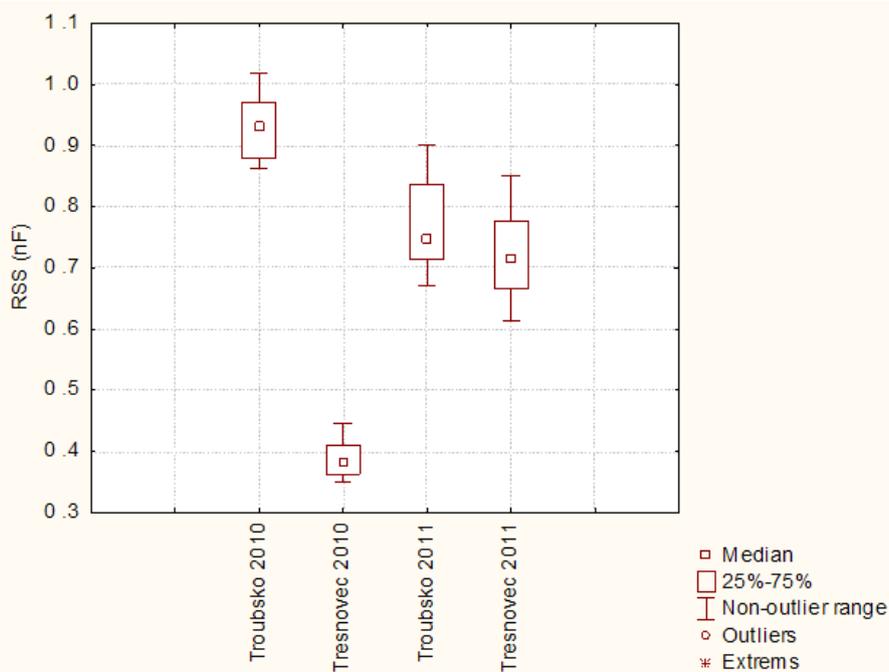


Figure 2: Variability of root system size (RSS) according to environments (means over all tested varieties)

Table 1: Comparison of genotypic means of root system size (RSS) at different development stages and environments (Means with the same letters are not significantly different)

Variety	Troubsko 2010		Tresnovec 2010		Troubsko 2011			Tresnovec 2011		
	STE ¹	FLO	STE	FLO	STE	FLO	RIP	STE	FLO	RIP
Medicus	1.24 ^{ab}	0.49 ^a	0.46 ^{bc}	0.25 ^{ab}	0.93 ^b	0.69 ^{ab}	0.40 ^a	0.78 ^{ac}	0.55 ^b	0.52 ^a
Seco	1.22 ^a	0.54 ^{ab}	0.46 ^b	0.30 ^{cd}	1.06 ^{ab}	0.61 ^a	0.41 ^a	0.82 ^{ac}	0.68 ^a	0.59 ^a
Semper	1.38 ^{bc}	0.54 ^{ab}	0.52 ^{ac}	0.33 ^{de}	1.10 ^a	0.87 ^c	0.70 ^d	0.88 ^{abc}	0.70 ^a	0.74 ^b
Severka	1.34 ^{ab}	0.56 ^{ab}	0.53 ^a	0.27 ^{bc}	1.14 ^a	0.72 ^{abc}	0.38 ^a	0.76 ^c	0.57 ^b	0.60 ^a
Sirte	1.21 ^a	0.56 ^{ab}	0.53 ^a	0.36 ^e	1.34 ^c	0.84 ^{cd}	0.53 ^c	0.96 ^b	0.84 ^c	0.75 ^b
Sito	1.48 ^c	0.55 ^{ab}	0.48 ^{abc}	0.22 ^a	1.15 ^a	0.71 ^{ab}	0.50 ^{bc}	0.95 ^b	0.69 ^a	0.54 ^a
Veronika	1.33 ^{ab}	0.50 ^a	0.49 ^{abc}	0.29 ^{cd}	1.18 ^a	0.63 ^{ab}	0.42 ^{ab}	0.89 ^{ab}	0.56 ^b	0.61 ^{ac}
Zlata	1.35 ^{abc}	0.61 ^{ab}	0.49 ^{abc}	0.25 ^{ab}	1.03 ^{ab}	0.73 ^{bc}	0.45 ^{abc}	0.89 ^{ab}	0.74 ^a	0.71 ^{bc}

¹ STE, stem elongation; FLO, flowering; RIP, ripening

SRL had higher RSS (higher electrical capacity) and lower NO₃⁻ nitrogen balance in the soil at the end of vegetation. Rather surprising was that varieties with a shorter and heavier root system had higher electrical capacity. Medicus had the highest electrical capacity on both locations in 2010 but showed second lowest RSS in Třešňovec in 2010, whereas it showed the highest SRL (six times higher than three varieties with the lowest SRL and two times higher than Veronika, the variety with the second highest SRL) (Figure 3). In Troubsko the genotypic difference in SRL was not so significant. Medicus showed four times higher values of SRL compared to the two varieties with the lowest SRL.

In Figure 4 a generally higher specific root length can be seen for Třešňovec which could be explained by a lower soil fertility, especially NO₃⁻ nitrogen, which was washed out as a result of longterm soil waterlogging. Waterlogging itself can also have significant influence on root system development, when plants are stressed by lack of air. The above mentioned specific characteristics of Třešňovec in 2010 (lower topsoil profile, little water-permeable subsoil layer, less fertile soil, long-term waterlogging) could explain the statistically significant difference between RLD 0-20 cm and RLD 0-40 cm ($r=-0.77^*$). It is probably the result of different strategies of the varieties in regard to root system development.

Acknowledgements

This research was supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports, grant MEB061013.

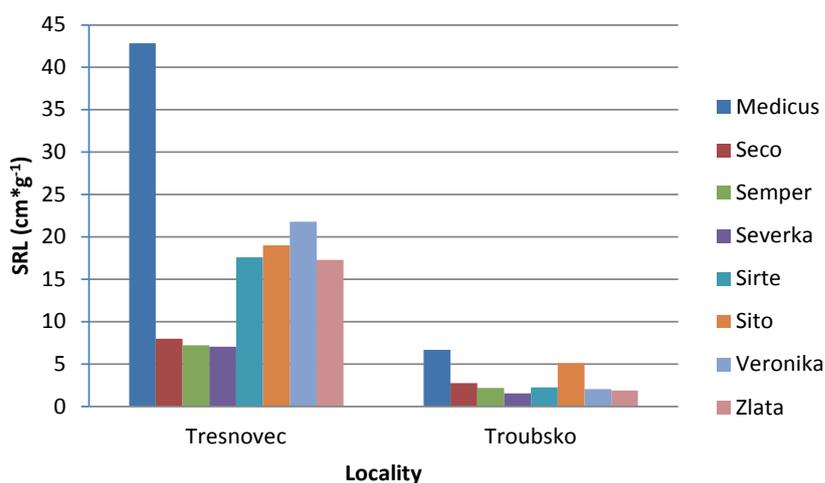


Figure 2: Variability of root system size (RSS) according to environments (means over all tested varieties)

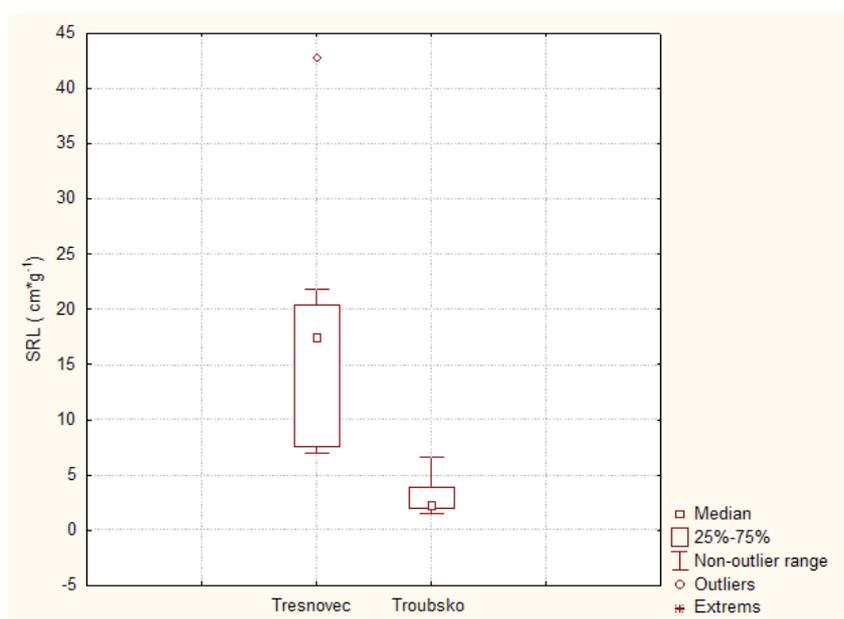


Figure 4: Variability in specific root length (SRL) at the two test locations (means over all varieties in 2010)

References

- BODNER G, KASTELLIZ A, LIEBHARD P, LOISKANDL W, HIMMELBAUER M, KAUL HP, 2011: Wurzeigenschaften von Zwischenfrüchten und ihre agroökologische Funktion. 1. Tagung Öst Ges Wurzelforschung, 13-14 Sep, LFZ Raumberg-Gumpenstein, Irdning, 67-74.
- CHLOUPEK O, 1977: Evaluation of size of a plant's root system using its electrical capacitance. *Plant Soil* 48: 525-532.
- CONSTANTINE J, BEAUDOIN N, LAURENT F, COHAN JP, DUYME F, MARY B, 2011: Cumulative effects of catch crops on nitrogen uptake, leaching and net mineralization. *Plant Soil* 341: 137-154.
- FRANCIS GS, BARTLEY KM, TABLEY FJ, 1998: The effect of winter cover crop management on nitrate leaching losses and crop growth. *J Agric Sci* 131: 299-308.
- HERRERA JM, LIEDGENS M, 2009: Leaching and utilization of nitrogen during a spring wheat catch crop succession. *J Env Qual* 38: 1410-1419.
- KURPELOVÁ M, COUFAL L, ČULÍK J, 1975: Agroklimatické podmínky ČSSR, 1. vyd. Příroda, Bratislava.
- MEISINGER JJ, HARGROVE WL, MIKKELSEN RL, WILLIAMS JR, BENSON VW, 1991: Effects of cover crops on groundwater quality. In: Hargrove WL (Ed.), *Cover crops for clean water*, Proc Int Conf, 9-11 Apr, Jackson, TN, pp. 57-68. Soil Water Cons Soc, Ankeny, IA.
- SMUKALSKI M, ROGASIK J, OBENAUF S, 1991: Cultivation of cover crops to control nitrate leaching. In: Hargrove WL (Ed.), *Cover crops for clean water*, Proc Int Conf, 9-11 Apr, Jackson, pp. 82-84. Soil Water Cons Soc, Ankeny, IA.
- STŘEDA T, DOSTÁL V, CHLOUPEK O, BODNER G, 2009: Šlechtění a výběr odrůd obilnin s větší tolerancí k suchu. *Úroda* 57(5): 10-12.
- THORUP-KRISTENSEN A, 2001: Are differences in root growth of nitrogen catch crops important for their ability to reduce soil nitrate-N content, and how can this be measured? *Plant Soil* 230: 185-195.

Note: The online version of the proceedings includes all figures in colour. It can be downloaded either from the homepage of the meeting (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/>) - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchtertagung - Saatzüchtertagung 2011) or requested from the corresponding author.

Testing of pre-harvest sprouting of wheat and triticale at the breeding station Uhretice, Selgen Corp., Czech Republic

Irena Bizova^{1*}, Martin Hromadko² and Karel Svec¹

Abstract

Germination of grains at the spike before harvest is called pre-harvest sprouting (PHS). Periods of rainfall and high humidity after grain maturity and before harvest can contribute to PHS, which can be seen of as a premature germination. Germination can begin when a grain absorbs moisture. Visible indications of PHS include grain swelling, germ discoloration, seed coat splitting and root and shoot emergence. Sprouting is influenced by the weather during ripening and pre-harvest time. Among varieties significant differences in regard to resistance to pre-harvest sprouting can be observed. Resistance to sprouting at the breeding station Uhretice is selected only on visual evaluation. Other methods can be used to evaluate grain dormancy, the influence of awns and wax layer, the effect of temperature and dry conditions before harvest or falling number test can be used to measure alpha-amylase activity.

Keywords

Falling number, pre-harvest sprouting, quality, *Triticosecale*, *Triticum aestivum*, weather

Introduction

Pre-harvest sprouting (PHS) results in reduced end-use quality. PHS occurs when wet or rainy conditions delay the harvest. Cool and moist conditions after grain maturity lead to increased risks of PHS (JIANG and XIAO 2005, THOMASON et al. 2009). Physiological mature grains start to germinate in the field. The more wet and dry cycles the grain experiences the more likely dormancy is broken and the grain germinates at the spike. Water must penetrate the seed coat and move into the seed before it can germinate. Results of pre-harvest sprouting are the decrease of test weight and the degradation of starch and protein. Reduction of kernel quality together with yield losses cause financial losses to farmers and food processors (CHAPMAN 2011). Timely harvest is one of the most important things if quality wheat is to be produced (FOSTER 2011). Testing for resistance to sprouting is a standard selection method in wheat and triticale breeding.

Material and methods

Five spikes from each test line are harvested at physiological grain maturity from field trial plots. The spikes are tied into

small bouquets with wire and labels marked with numbers. The spikes are soaked in water for 3 h to absorb water. Afterwards the spikes are placed on a steel crosshatch in a way that no spike touches another spike (*Figure 1*).

The spikes are continuously irrigated with water (*Figure 2*). The time period between irrigation depends on weather conditions but it is regulated in a way that constant wet conditions are provided. After 7 and 14 d the degree of sprouting is scored on a 1 to 9 scale (9=extensive sprouting on the spike, 1=no sprouting, *Figure 3*). Spikes with fungal infections are discarded.



Figure 1: Spikes on the steel crosshatch



Figure 2: Irrigation of spikes

¹ Selgen a.s., Plant Breeding Station Uhretice, CZ-538 32 UHRETICE 11

² Selton s.r.o., Research Centrum, Stupice 24, CZ-250 84 SIBRINA

* Ansprechpartner: Irena BIZOVA, uhretice@selgen.cz



Figure 3: Scoring of pre-harvest sprouting on a 1 to 9 scale (1=no sprouting, 9=extensive sprouting) in increments of two units (scores 1, 3, 5, 7 and 9 from left to right)

Table 1: Preharvest sprouting scores and falling number (FN) of winter triticale varieties (2006-2009)

Year	Evaluation	Kinerit	Nazaret	Beneto	Kolor	Presto
2006	7 d	7	6	7	7	6
	14 d	5	3	6	7	2
	Mean	6	5	7	7	4
	FN	62	62	62	62	62
2007	7 d	8	7	7	8	8
	14 d	7	6	6	7	8
	Mean	8	6	7	8	8
	FN	162	62	65	62	62
2008	7 d	9	6	7	7	6
	14 d	8	4	7	6	5
	Mean	9	5	7	7	6
	FN	78	62	69	62	62
2009	7 d	8	7	8	8	-
	14 d	6	5	5	6	-
	Mean	7	6	7	7	-
	FN	94	69	69	62	-

Results and discussion

Sprouting is influenced by both the genotype and environment. Among the varieties which we tested from 2006 to 2011 significant differences of resistance to sprouting were observed. Our evaluation of sprouting resistance was based only on visual evaluation. Connections with grain dormancy, influence of awns and wax layer, effects of temperature and dry conditions before harvest were not considered. Every year falling number was determined and we had not found statistical deviations between the sprouting and the falling number test. Testing for resistance to sprouting was used as standard selection method in the creation of new breeding lines and selection of parent varieties, e.g. wheat varieties Bohemia, Sultan, Elly and Moldau, and triticale varieties Kinerit and Nazaret.

References

JIANG GL, XIAO S, 2005: Factorial cross analysis of pre-harvest sprouting resistance in white wheat. *Field Crop Res* 91:63-69.

CHAPMAN B, 2011: Economic impact of pre-harvest sprouting, seed dormancy and germination from a farmer perspective. *Proc 12th Int Symp Pre-harvest sprouting in cereals*, 24-27 Jul, Red Deer, Alberta, Canada, p. 11.

FOSTER S, 2011: Understanding dormancy in cereals and its direct effect on seed quality. *Proc 12th Int Symp Pre-harvest sprouting in cereals*, 24-27 Jul, Red Deer, Alberta, Canada, p. 13.

THOMASON WE, HUGHES KR, GRIFFEY CA, PARRISH DJ, BARBEAU WE, 2009: Understanding pre-harvest sprouting of wheat. *Virginia Cooperative Extension Publication 424-060*. Coll Agric Life Sci, Virginia Polytech Inst State Univ, Blacksburg, VA.

Table 2: Preharvest sprouting scores and falling number (FN) of winter wheat breeding lines (2008-2011)

Quality class	Breeding line	Pedigree	2008		2009		2010		2011	
			7 d	14 d						
E	SG-S1393	Hana/Zdar//2xAlidos	9	8	9	8	6	6	9	9
A	SG-U541	Hana/Mercia	8	6	8	8	4	4	5	5
A	SG-U8077	540//6192//540//Kontrast	9	6	9	7	4	4	4	4
A	SG-S1029	Svitava/Acclaim	9	8	9	9	6	6	7	6
A	SG-U9159	3101/Caprimus	8	7	9	9	6	6	8	6
A	SG-S115	Svitava/Acclaim	7	7	8	8	6	6	7	7
A	SG-RUB70	RU23/Alveor	8	7	8	8	5	5	8	5
A	SG-S227	Saskia/Jing5418	8	7	9	9	4	4	8	5
A	SG-S1165	Ebi/CWW95/26	8	7	8	8	4	4	8	5
B	SG-U8069	Kontrast/6192//2xThesee	8	6	9	7	6	6	9	6
B	SG-RU24	Hubertus/153a	7	6	9	9	5	5	6	6
B	SG-S1038	Saskia/Svitava//Charger	9	7	9	9	5	5	9	6
B	SG-S1337	Svitava/Sepstra	9	7	9	9	4	4	6	6
B	SG-S1875	Samanta/Estica	8	6	9	9	6	6	8	7
C	SG-U7125	Ceb8609/510b-92	9	9	7	7	6	6	9	9
C	SG-S1800	Hana/Estica	9	8	8	8	6	6	8	8
			FN							
			277	277	414	414	414	414	528	528
			322	322	400	400	400	400	520	520
			408	408	430	430	430	430	470	470
			282	282	475	475	475	475	490	490
			302	302	386	386	386	386	446	446
			422	422	508	508	508	508	411	411
			250	250	338	338	338	338	354	354
			370	370	471	471	471	471	354	354
			362	362	371	371	371	371	510	510
			457	457	315	315	315	315	472	472
			312	312	422	422	422	422	421	421
			375	375	393	393	393	393	425	425
			413	413	392	392	392	392	405	405
			191	191	420	420	420	420	370	370
			202	202	270	270	270	270	473	473
			344	344	372	372	372	372	465	465

Süßlupinen als alternative Eiweißfrüchte für Biobetriebe? Sweet lupines as alternative protein-feed for ecological farms?

Waltraud Hein^{1*} und Hermann Waschl

Abstract

Sweet lupines are corn legumes with a high protein content which would be a good alternative legume to soybeans in organic farming. Lupines have a high value in spite of crop rotation as well as peas and faba beans but they have more protein. The only problem is their shortage of competition opposite weeds so ecological farmers need clean fields. The Department for Ecological Farming of the ACRE Raumberg-Gumpenstein carried out field trials with lupines in the years 2009-2011 at the experimental station Lambach and on farms in Upper-Austria. The aims were to find out the best varieties for each region and the best methods of production. Grain yields were about 2000 kg·ha⁻¹ which is in the range of reported data. Protein content was between 35 and 40% which comes near to soybeans. Nevertheless, there are many efforts to do to convince farmers of the advantages of sweet lupines.

Keywords: crude protein content, grain legumes, *Lupinus*, organic farming, sweet lupines, varieties

Einleitung

Süßlupinen zählen ebenso wie Erbsen und Ackerbohnen zu den großkörnigen Leguminosen. Diese stellen auf Grund ihrer Eigenschaft, Stickstoff sammeln zu können, wertvolle Fruchtfolgeglieder dar, sowohl im konventionellen als ganz besonders im biologischen Landbau. Solche Kulturen liefern im Biolandbau wichtiges Protein für die Tierernährung, was im Hinblick auf die ab 2012 geltende Verordnung, im Biolandbau bei allen Tierarten ausschließlich biologisch erzeugtes Eiweißfutter einsetzen zu dürfen, einen besonderen Stellenwert erhält.

So wertvoll diese großkörnigen Leguminosen auch sind, so stark ist in den letzten Jahren die Anbaufläche für diese Kulturen zurückgegangen, weil große Ertragsschwankungen, Krankheiten und Schädlinge die Attraktivität dieser Kulturarten stark reduziert haben. Allerdings wird angesichts der neuen Bestimmungen die Notwendigkeit, großkörnige Leguminosen im Biolandbau verstärkt anzubauen, offensichtlich. Gerade in diesem Zusammenhang sind auch Bemühungen zu verstehen, alternative Körnerleguminosen, wie Süßlupinen, in die Fruchtfolgen aufzunehmen, um die tierische Eiweißversorgung sicher stellen zu können.

Innerhalb der Gattung *Lupinus* gibt es rund 300 Arten, von denen bisher nur 4 für die intensive Nutzung zur Korngewinnung kultiviert wurden, das sind: *Lupinus albus* (Weiße Lupine), *Lupinus mutabilis* (Anden-Lupine), *Lupinus luteus* (Gelbe Lupine) und *Lupinus angustifolius* (Blaue Lupine), wobei die letzten beiden erst seit rund 60 Jahren genutzt werden (SCHUSTER 1998).

Vorzüge der Lupinen liegen in ihrem hohen Eiweißgehalt, der 35 bis 40% beträgt und somit fast an jenen von Sojabohnen heran kommt. Dem gegenüber steht allerdings der Nachteil der Konkurrenzschwäche der Süßlupine im Hinblick auf Unkräuter, aus der ein später Bestandesschluss und in Folge oft eine starke Verunkrautung resultieren.

Um den Landwirten in Fragen der Produktionstechnik und Sortenwahl mit Ratschlägen zur Seite stehen zu können, führte die Abteilung Ackerbau des Institutes für Biologische Landwirtschaft des LFZ Raumberg-Gumpenstein verschiedene Feldversuche mit Parzellen- und Streifenversuchen auf unterschiedlichen Standorten in Oberösterreich durch.

Material und Methoden

In den Jahren 2009 bis 2011 wurden an verschiedenen Standorten im oberösterreichischen Raum Feldversuche mit unterschiedlichen Sorten der Blauen Süßlupine durchgeführt. Die meisten dieser Versuche waren Streifenversuche ohne Wiederholungen, die Versuche an der Außenstelle der Abteilung in Lambach Stadl-Paura Parzellenversuche. *Tabelle 1* bringt eine Übersicht über Standorte und Sorten.

Die Sorten sind nicht alle in der Österreichischen Sortenliste angeführt. In allen drei Versuchsjahren waren nur die Sorten Borlu, Boruta und Prima gelistet (AGES 2009, 2010, 2011), wobei allerdings kein Saatgut der Sorte Prima erhältlich war. So wurde der überwiegende Teil des Saatgutes aus Deutschland besorgt.

Damit Daten aus verschiedenen Ackerbaugebieten Oberösterreichs vorliegen, wurden die Versuche stark gestreut, wobei das Jahr 2010 mit 5 verschiedenen Standorten, die auch geerntet werden konnten, auffällt. Die beiden im Jahr 2009 in Lambach angelegten Lupinenversuche fielen einem schweren Hagelschlag Anfang Juli zum Opfer.

Bei den Streifenversuchen wurde die Ertragsfeststellung unterschiedlich vorgenommen. Bei den Flächen, welche näher zur Außenstelle Lambach gelegen sind, erfolgte die Ernte mit dem Parzellenmähdrescher. Dabei wurde vorher

¹ HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Institut für Biologische Landwirtschaft, Raumberg 38, A-8952 Irdning

* Ansprechpartner: Waltraud HEIN, waltraud.hein@raumberg-gumpenstein.at

Tabelle 1: Übersicht über die Lupinenversuche des LFZ Raumberg Gumpenstein (2009-2011)

Table 1: Sites and varieties of the sweet lupine field trials of the LFZ Raumberg-Gumpenstein (2009-2011)

	Versuchsjahr		
	2009	2010	2011
Orte	Lambach Waldneukirchen Neumarkt i. Mkr. Gaspoltshofen	Lambach Waldneukirchen Dorf/Pram Neumarkt i. Mkr. Neukirchen/Enknach	Lambach
Sorten	Boregine Borlu Haagena Probtor	Boregine Borlu Haags Blaue Probtor Sanabor Vitabor Boruta	Boregine Borlu Haags Blaue Probtor Sanabor Vitabor Boruta Haagena Sonet

die sogenannte Restfläche mit einem großen Mährescher geerntet und die ausgemessenen Parzellen für die Ernte mit dem Parzellenmährescher stehen gelassen. Bei jenen Flächen, die mehr als 100 km von Lambach entfernt lagen, wurde die Ernte der Sortenstreifen mit einem großen Mährescher vorgenommen, dabei wurde jede Sorte in einen Big-Bag gefüllt, welcher anschließend gewogen wurde.

Nach der Ernte erfolgte die Probenahme für die chemische Analyse im Labor des LFZ Raumberg-Gumpenstein. Jede Probe wurde auf ihren Gehalt an Wasser und Rohprotein nach den Standardmethoden untersucht. Alle Kornerträge wurden in der Folge auf 86% Trockenmassegehalt berechnet. Die übrigen Erhebungen am Feld umfassten Zählungen zur

Pflanzenzahl·ha⁻¹, ebenso eine Zählung der Anzahl Hülsen pro Pflanze, sowie eine Messung der Wuchshöhe. Dazu wurden auf 2 mal 5 Laufmetern pro Sorte diese Zählungen durchgeführt. Dabei wurde großer Wert darauf gelegt, dass es sich bei den Zählstrecken um durchschnittliche Feldbestände handelte; große Fehlstellen wurden genauso wenig in diese Zählungen mitaufgenommen wie Feldstücke, die besonders stark verunkrautet waren.

Ergebnisse

Abbildung 1 bringt einen Überblick über die Kornerträge der einzelnen Lupinensorten, jahrweise gemittelt über alle Standorte. Daraus geht hervor, dass die in den Versuchen gewonnenen Kornerträge im Bereich der in der Literatur beschriebenen Kornerträge unter mitteleuropäischen Standortbedingungen liegen (PAFFRATH 2004, BÖHM und AULRICH 2009). Natürlich gibt es starke Schwankungen im Kornertrag von Betrieb zu Betrieb, wobei der Grad der Verunkrautung einen wesentlichen Einfluss auf die Ertragshöhe ausübt. Trotzdem wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Ernteparzellen nicht gerade ein besonders stark verunkrautetes Feldstück betrafen.

Was die Rohproteingehalte betrifft, liegen diese zwischen 35 und 40%, womit sie nur mehr geringfügig unter den Rohproteingehalten von Sojabohnen bleiben (RÖMER 1994). Ein wichtiges Kriterium für die Verwertung der Lupine sowohl zu Futterzwecken als auch für die menschliche Ernährung stellt der Alkaloidgehalt von Lupinen dar. Obwohl bei den heute zur Verfügung stehenden Lupinensorten der Alkaloidgehalt durch Züchtungsfortschritte ohnehin schon sehr gering ist, wurden Obergrenzen von 0,05% für die Tierernährung und 0,02% für die Lebensmittelverwertung festgelegt (BÖHLER und DIERAUER 2011).

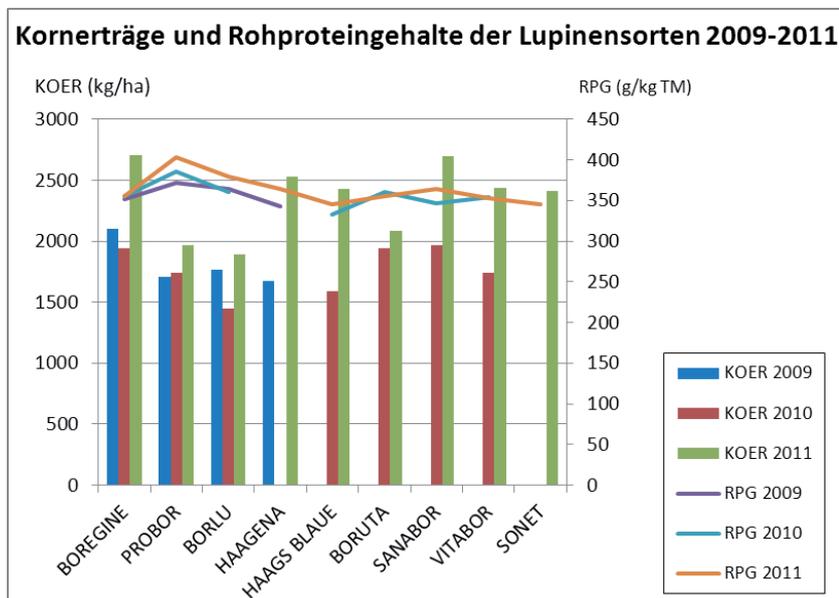


Abbildung 1: Kornerträge (KOER) und Rohproteingehalte (RPG) der Lupinensorten (2009-2011)

Figure 1: Grain yield (KOER) and crude protein content (RPG) of sweet lupine varieties (2009-2011)

Lupine als Pflanze mit einer Pfahlwurzel und einem verzweigten Seitenwurzelsystem trägt zur Strukturverbesserung des Bodens bei und kann dadurch auch schwer lösliches Phosphat im Boden mobilisieren, was grundsätzlich auf die Nachfrucht sehr positiv wirkt. Das große Problem im Biolandbau bleibt bei Lupine die Verunkrautung, besonders, weil die Süßlupine durch ihr morphologisches Erscheinungsbild sehr konkurrenzschwach im Vergleich zu manchen Unkrautpflanzen ist. Eine sorgfältige Auswahl der Flächen sowie eine rechtzeitige Durchführung von Pflegemaßnahmen tragen wesentlich zur Erzielung eines wirtschaftlich vertretbaren Erfolgs bei.

Danksagung

Ein herzlicher Dank ergeht an alle Landwirte, bei denen Streifenversuche durchgeführt werden konnten, für das zur Verfügung Stellen der Versuchsflächen und den zusätzlichen Arbeitsaufwand.

Literatur

- AGES (Hrsg.) 2009, 2010, 2011: Österreichische Sortenliste 2009, 2010, 2011. Schriftenreihe 03/2009, 03/2010, 03/2011.
- BÖHLER D, DIERAUER H, 2011: Merkblatt Biolupinen. FiBL, Frick.
- BÖHM H, AULRICH K, 2009: Anbau der Blauen Lupine (*Lupinus angustifolius*) mit unterschiedlichen Reihenabständen und Bewertung der Futterqualität mittels NIRS. In: Mayer J, Alföldi T, Leiber F et al. (Hrsg.), Beiträge zur 10. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, 11-13 Feb, Zürich, 127-130. Verlag Dr. Köster, Berlin.
- PAFFRATH A, 2004: Anbau von Lupinen im Ökologischen Landbau. Beraterrundbrief der Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen [Internet: www.oekolandbau.nrw.de/pdf/pflanzenbau/Futterbau/lupinen.pdf; besucht am 16 Jan 2011].
- RÖMER P, 1994: Lupinen - Verwertung und Anbau. 2. Aufl. Gesellschaft zur Förderung der Lupinen e.V., Rastatt.
- SCHUSTER WH, 1998: Gattung *Lupinus* L. In: Schuster WH, Alkämper J, Marquard R, Stählin A (Hrsg.), Leguminosen zur Kornnutzung : Kornleguminosen der Welt. GEB-Giessener Elektronische Bibliothek, Universität Giessen [Internet: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/320/>].

Anmerkung: Die Online-Version des Tagungsbandes enthält die Abbildung in Farbe und kann über die Homepage der Jahrestagung (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/> - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchertagung - Saatzüchertagung 2011) oder den korrespondierenden Autor bezogen werden.

Erfassung der genetischen Variabilität agronomischer Eigenschaften von Blauer Lupine

Assessment of genetic variability of agronomic parameters of narrow-leafed lupin

Anne-Kathrin Klamroth^{1*}, Regine Dieterich¹, Bernhard Saal¹, Inge Broer² und Jana Huckauf²

Abstract

Genotype by environment (G×E) interaction in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) has been investigated for yield and protein content in a two-year field trial. Eight varieties with restricted branching were grown at four sites in Mecklenburg-Western Pomerania and Bavaria. The trials demonstrate, that site has a greater influence on yield (significant at $P < 0.01$) than site×year, site×year×genotype and genotype. Due to the limited set of breeding material the G×E component was of minor importance ($P = 0.08$). For grain yield, the strong interaction between site and year was caused by the extreme site of Bornhof. The highest yield was found in 2011 at Groß Lüsewitz. Yield was more affected by site than by year. The crude protein content was also significantly influenced by site and year. Between the year 2010 and 2011 less differences were found among the sites. Yield was negatively correlated with crude protein content. The differences in crude protein yield reflect the differences in yield indicating the stronger impact of grain yield than of protein content.

Keywords

Crude protein content, crude protein yield, genotype by environment interaction, *Lupinus angustifolius*, yield

Einleitung

Die Körnerleguminosen stellen seit den Anfängen der Landwirtschaft wertvolle Kulturpflanzen dar. Neben den positiven Aspekten für die landwirtschaftliche Nutzung im ökologischen und konventionellen Anbau können sie auch für die Tier- und Humanernährung eingesetzt werden. Wegen ihres hohen Gehaltes an lysinreichem Eiweiß im Samen nehmen sie eine besondere Stellung in der Fütterung und Ernährung der Menschen ein (OSBORNE 1924). Die züchterische Eliminierung der Bitterstoffe macht die Blaue Lupine unter den Körnerleguminosen zu etwas Besonderem. Diese als Süßlupine bezeichneten Varietäten dürfen aus ernährungsphysiologischer Sicht einen Alkaloidgehalt von 0,02% nicht überschreiten (RÖMER 2007). Trotz vieler positiver Gründe für den Anbau von Leguminosen,

insbesondere der Blauen Lupine, steckt der Anbau in einer Krise (EICKMEYER 2009). Gründe dafür liegen in den relativ niedrigen Preisen für Mineralstoffe, der einseitigen Nutzung von Kulturarten mit hohen Deckungsbeiträgen in der Fruchtfolge sowie in der weitgehenden Deckung des Proteinbedarfes in der Tierfütterung durch Sojaextraktionschrot. Nicht nur die Rahmenbedingungen für den Anbau von Körnerleguminosen sind schwierig, sondern auch die kulturarteneigenen Probleme sorgen für eine geringe Akzeptanz im landwirtschaftlichen Anbau. Geringe und instabile Erträge sowie schwankende Qualitäten stellen Negativfaktoren dar (EICKMEYER 2009). Die Herausforderung für die Züchtung liegt darin hohe, stabile und sichere Erträge und Qualitäten zu erzeugen um eine höhere Akzeptanz bei den Landwirten zu erreichen. Für den landwirtschaftlichen Anbau und für die Verarbeitung ist es daher notwendig die Schwankungsbreite der Ertragsparameter zu kennen. Zu diesem Zweck wurden die Ertragsparameter von Sortenmaterial und Sorten in verschiedenen Umwelten in einem zweijährigen Feldversuch getestet.

Material und Methoden

In einem zweijährigen Feldversuch wurden 8 determinierte (unverzweigte) Sorten und Stämme geprüft. Die Prüfung erfolgte an vier Standorten in den Bundesländern Mecklenburg-Vorpommern und Bayern. Die klimatischen und edaphischen Merkmale der Standorte sind in *Tabelle 1* aufgeführt. Der Versuch wurde als randomisierte Blockanlage mit vier Wiederholungen und einer Parzellengröße von 3,5 m² (Steinach, Dratow), 3,95 m² (Groß Lüsewitz) und 10,5 m² (Bornhof) angelegt.

Die Pflanzen wurden nach der Reife (BBCH 89) geerntet und getrocknet. Anschließend erfolgte die Bestimmung und Auswertung folgender Ertragsparameter: Ertrag (dt·ha⁻¹), Rohproteingehalt (%), Rohproteinertrag (dt·ha⁻¹) und Tausendkorngewicht (g). Die Ermittlung des Rohproteingehaltes erfolgte mittels NIR (Nah-Infra-Rot-Spektroskopie) mit einem Corona 45VISNIR (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena). Aus dem Rohproteingehalt und dem Ertrag wurde der Rohproteinertrag (dt·ha⁻¹) errechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm IBM® SPSS® Statistics 19 (IBM Corp., Somers, NY).

¹ Saatwucht Steinach GmbH & Co KG, Klockower Straße 11, D-17219 BOCKSEE

² Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Agrarbiotechnologie und Begleitforschung zur Bio- und Gentechnologie, Justus-von-Liebig-Weg 8, D-18059 ROSTOCK

* Ansprechpartner: Anne-Kathrin KLAMROTH, anne-kathrin.klamroth@saatwucht.de

Tabelle 1: Beschreibung der Versuchsstandorte
Table 1: Characteristics of experimental sites

State Site	Mecklenburg-Western Pommern			Bavaria
	Bornhof	Groß Dartow	Groß Lüsewitz	Steinach
Land value number	20	30-35	47	72
Soil type ¹	S	sL	IS	L, sL
pH value	5.3	6	5.8	6
Long-term rainfall (mm)	558	558	688	803
Mean annual temperature (°C)	8.2	8.2	8.3	7.8

¹ IS, loamy sand; sL, sandy clay; S, sand; L, clay

Ergebnisse

In den beiden Versuchsjahren traten über alle vier Standorte erhebliche Ertragsschwankungen auf. Im Jahr 2010 konnten Erträge im Mittel von 25 dt·ha⁻¹ und im Jahr 2011 von 29 dt·ha⁻¹ erreicht werden. Die höchsten Erträge waren im Jahr 2011 in Groß Lüsewitz zu finden. Auf den Standorten mit leichteren Böden wie Bornhof und Dratow sind im Jahresmittel deutlich geringere Erträge zu verzeichnen. Auf den besseren Standorten Steinach und Groß Lüsewitz liegt der Ertrag in beiden Versuchsjahren deutlich höher. Die Mehrerträge für das Jahr 2011 sind durch die höheren Niederschläge zu erklären. Die in Mecklenburg-Vorpommern und Bayern gelegenen Standorte zeichnen sich durch einen niedrigen pH-Wert (zwischen 5,3 und 6) aus und sind für den Anbau der Blauen Lupine besser geeignet als Standorte mit einem pH-Wert über 6 (SCHMIECHEN et al. 2002). Die Erträge der Genotypen werden demnach vom Standort stärker beeinflusst als vom Jahr. Zwischen Ort und Jahr existiert eine signifikante Wechselwirkung. Diese Wechselwirkungen werden besonders am Extremstandort Bornhof deutlich beeinflusst, welcher sich durch geringe Erträge auszeichnet. Auch der Genotyp hat einen geringeren Einfluss als der des Jahres. Im Vergleich zu den eingetragenen Sorten Boruta und Haags Blaue erreichen die besten Stämme einen deutlichen Mehrertrag, während die schlechteren Stämme ähnlich hohe Mindererträge aufweisen.

Im Weiteren wurden die Rohproteingehalte mittels Nah-Infrarot-Spektroskopie untersucht. Der Rohproteingehalt ist nicht von der Bodenbeschaffenheit abhängig, sondern von dem Abreifeverhalten sowie der Temperatur. Er schwankt zwischen den Versuchsjahren über alle Orte. Zwischen den Jahren gab es geringe Standortunterschiede. Eine Verbesserung des Rohproteingehalts oder des Ertrags gegenüber den Ausgangssorten war nicht zu beobachten. Bei der statistischen Überprüfung wurden signifikante Standort- und Jahresunterschiede festgestellt.

Der Rohproteingehalt ist negativ mit dem Kornertrag korreliert und besitzt daher kaum Einfluss auf den Rohproteinertrag. Dadurch spiegeln die mittleren Rohproteinerträge die Kornerträge wieder. Unterschiede zwischen den Kornerträgen und Rohproteinerträgen konnten nicht gefunden werden. Die geringen Rohproteinerträge der Standorte Bornhof und Dratow im Vergleich zu den Standorten Steinach und Groß Lüsewitz sind der geringen Wasserversorgung und Bodengüte geschuldet.

Diskussion

Alle geprüften determinierten Sorten und Stämme weisen einen höheren Standorteinfluss als Sorteneinfluss auf die

Ertragsparameter wie Ertrag, Rohproteingehalt und Rohproteinertrag auf. Der Standorteinfluss auf die jeweiligen Sorten und Stämme variiert, was vorherige Untersuchungen von JANSEN und KUHLMANN (2007) bestätigt. Der Rohproteingehalt wird durch die Temperatur und das Abreifeverhalten beeinflusst, was zu einer geringeren Umweltabhängigkeit im Vergleich zum Ertrag führt. Da es eine negative Korrelation von Ertrag und Rohproteingehalt gibt, geht der höhere Rohproteingehalt am Standort Bornhof im Vergleich zu den anderen Standorten mit einer deutlich geringeren Tausendkornmasse einher. Die wenigen und kleinen Körner bekommen durch die Source-Sink-Umlagerung mehr Stickstoff aus den Blättern, was zu einem höheren Rohproteingehalt führt. Die Ertragsunterschiede an den verschiedenen Standorten werden durch die verschiedenen Bodenverhältnissen und dem pH-Wert hervorgerufen. Es sind signifikante Unterschiede bei den Ertragsparametern über die Orte zu finden. Durch das enge Sortenmaterial sind große Unterschiede in der Genotyp-Umwelt-Interaktion kaum vorhanden.

Zusammenfassung

Auf allen vier Standorten in Mecklenburg-Vorpommern und Bayern wurden in vierfacher Wiederholung acht determinierte Sorten und Stämme von Blauer Lupine hinsichtlich Ertrag, Rohproteingehalt und -ertrag geprüft. An den verschiedenen Standorten wurden Unterschiede im Ertragspotenzial und dem Rohproteingehalt festgestellt. Der Einfluss des Standortes auf die Ertragsparameter ist im Vergleich zum Sorteneinfluss so hoch, dass letzterer vernachlässigbar ist. Dieses ist dem engen Sortenmaterial geschuldet. Die größte Bedeutung für die Standortunterschiede haben die Bodenverhältnissen und Niederschlagsmengen. Durch die negative Korrelation zwischen Ertrag und Rohproteingehalt findet man am Extremstandort Bornhof einen hohen Rohproteingehalt der mit einer geringen Tausendkornmasse korreliert.

Danksagung

Die Arbeiten des Jahres 2011 wurden durch das Forschungsvorhaben 03WKBV01A (Innovative regionale Wachstumskerne) vom Bundesministerium für Bildung und Forschung finanziell unterstützt.

Literatur

- EICKMEYER F, 2009: Alte und neue Herausforderungen in der Züchtung von Leguminosen, *Journal für Kulturpflanzen* 61: 352-358.
- JANSEN G, KUHLMANN JK, 2007: Proteinuntersuchungen in Einzelsamen zur züchterischen Erhöhung des Eiweißgehaltes. In: Zikeli S, Claupein W, Dabbert S, Kaufmann B, Müller T, Valle Zarate A (Eds.), *Zwischen Tradition und Globalisierung*, Beiträge zur 9. Wissenschaftstagung ökologischer Landbau, 20-23 Mar, Universität Hohenheim, pp. 263-266. Verlag Dr. Köster, Berlin.
- OSBORNE TB, 1924: *The vegetable proteins*. Monographs in biochemistry. Longmans, Breen & Co London.
- RÖMER P, 2007: *Lupinen - Verwertung und Anbau*, 5. Aufl. Gesellschaft zur Förderung der Lupine e.V., Bocksee. [Internet: http://www.lupinenverein.de/Informationen/5_Auflage-1.pdf; verifiziert 2 Feb 2012]
- SCHMIECHEN U, SCHACHLER B, SAUERMAN W, 2011: Anbau- ratgeber Blaue Stüßlupine, UFOP-Praxisinformation, Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP), Berlin. [Internet: http://www.ufop.de/downloads/PI_Blaue_Suesslupine_240611.pdf; verifiziert 2 Feb 2012].

Einfluss von Keimfähigkeit und Triebkraft auf den Feldaufgang und Ertrag bei Sojabohnen

Influence of germination and seed vigour on field emergence and yield of soybean

Benno Voit¹*, Georg Salzeder, Alois Aigner und Berta Killermann

Abstract

For crop species with a higher demand on temperature e.g. soybean, maize and sorghum the germination test is not sufficient for sowing. The germination test is done under optimal conditions, however, in the fields there are not always optimal conditions but e.g. low temperatures or wet soil. Therefore, a further test is urgently needed with tightened conditions to determine seed vigour. This test is the so-called "Cold Test". As at present for soybeans no cold test method exists, the maize method is used. By means of field trials using different seed qualities (high, medium and low germination values) it will be tested if the results of the cold tests are more related to field emergence than the germination values.

Keywords

Cold test, field emergence, germination, *Glycine max*, seed vigour, soybean

Einleitung

Die Sojabohne (*Glycine max* (L.) Merr.) ist eine Kurztagspflanze mit hohen Wärmeansprüchen und gedeiht daher am besten in warmen Körnermaisbauanlagen. Ähnlich wie beim Mais wurden bei der Sojabohne züchterische Fortschritte hinsichtlich einer früheren Abreife erzielt. Damit ist ein Vermehrungsanbau in günstigen Lagen Bayerns möglich. Die Vermehrung von Soja ist in Bayern Neuland und bedarf wissenschaftlicher Begleitung.

Methodik und Ergebnisse

Die Keimfähigkeit im Labor wird unter optimalen Bedingungen im sterilen Quarzsand bei 25°C festgestellt (ISTA 2011). Im Praxisanbau auf dem Feld liegen nur selten Optimalbedingungen vor. Kalte oder nasskalte Witterung nach der Saat und während der Keimung stellen hohe Anforderungen an das Saatgut. Deshalb stellt sich die Frage, ob für die Berechnung der Aussaatstärke die Keimfähigkeit die richtige Bezugsgröße ist, oder ob nicht der Triebkraft- bzw. Kalttestwert herangezogen werden soll (ISTA 1995). In den internationalen Vorschriften der ISTA zur Prüfung von Saatgut gibt es derzeit keine Untersuchungsmethode

für die Triebkraftprüfung von Sojabohnen. Daher wird die Triebkraftmethode von Mais übernommen (VOIT et al. 2010). Dazu werden die Proben in Ackererde eine Woche bei 10°C in den Klimaschrank gestellt. Anschließend eine Woche bei 25°C in die Klimakammer gebracht. Alternativ soll dazu eine Triebkraftprüfung bei 10°C konstanter Temperatur mit getestet werden. Während der kühlen Phase haben Pilze und Mikroorganismen die Möglichkeit, insbesondere aus dem Boden, die Keimung zu beeinträchtigen. Die Folge sind meist anomale Keimlinge oder tote Samen. Nach bisherigen Beobachtungen scheint die Sojabohne nicht besonders pilzanfällig während der Keimung zu sein. Anhand der Ergebnisse des Feldaufganges soll entschieden werden, welche Methode den Wert liefert, der dem Feldaufgang am nächsten ist. Nach der Ermittlung des Feldaufganges werden die Parzellen weiterhin beobachtet. Jede Parzelle wird gedroschen und der Ertrag ermittelt. Anhand der Ertragsdaten kann entschieden werden, wie niedrig der Triebkraftwert sein darf um noch einen akzeptablen Feldaufgang und Ertrag erwarten zu können.

Anhand der Ertragsergebnisse von unterschiedlichen Saatgutqualitäten (hohe, mittlere und niedrige Keimfähigkeit) lassen sich Rückschlüsse ziehen über den Einfluss von Triebkraft und Feldaufgang.

Für den Sojabohnenanbau ist die Abreife ein wesentlich begrenzender Faktor. Wir erwarten deshalb mit Spannung die Qualität des geernteten Sojabohnensaatgutes. Insbesondere im Hinblick auf die Kriterien Keimfähigkeit und Triebkraft. Aus diesem Grund werden zwei unterschiedliche Sorten angebaut. Die frühreife Sorte Merlin und die etwas spätere Sorte Cordoba. Die Versuchsstandorte wurden nach der Abreife ausgewählt. Rotthalmünster als klimatisch sehr günstiger Standort hat die besten Voraussetzungen für eine gute Abreife. Dagegen gilt der zweite Standort in Oberhummel bei Freising als klimatisch durchschnittlich.

Zusammenfassung

Bei Fruchtarten mit höheren Temperaturansprüchen wie Sojabohnen, Mais und Hirse ist die Keimfähigkeit nicht geeignet zur Berechnung der Aussaatstärke für den Feldanbau. Die Keimfähigkeit wird im Labor unter Optimalbedingungen festgestellt. Diese Bedingungen liegen im Feld nur

¹ Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, AG Saatgutuntersuchung/Saatgutforschung, Lange Point 6, D-85354 FREISING

* Ansprechpartner: Benno Voit, benno.voit@lfl.bayern.de

selten vor, deshalb ist eine Keimprüfung unter verschärften Bedingungen, die sogenannte Triebkraft- oder Kalttestprüfung notwendig. Da es für Sojabohnen derzeit keine Untersuchungsmethode gibt, wird dasselbe Verfahren wie bei Mais angewandt. Anhand von Feldversuchen wird überprüft, ob die Triebkraftwerte näher an den Feldaufgangsergebnissen liegen als die Keimfähigkeitswerte.

Literatur

- ISTA, 1995: Handbook of vigour test methods, 3rd Ed. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland.
- ISTA, 2011: International rules for seed testing, Ed. 2011. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland.
- VOIT B, SCHNELLHAMMER R, EDER J, KILLERMANN B, 2010: Einfluss von Keimfähigkeit und Triebkraft auf den Feldaufgang und Ertrag bei Mais. VDLUFA Schriftenreihe 66: 560-565.

Entwicklung einer *in vitro* Vermehrungsmethode für Gelben Enzian (*Gentiana lutea* L.)

Development of an efficient micropropagation method for *Gentiana lutea* L.

Maria Granilshchikova und Elisabeth Kopper^{1*}

Abstract

Gentiana lutea, also known as bitter root is part of the *Gentianaceae* plant family. It is a native of the Alpine and sub-Alpine areas of central and southern Europe. Gentian root has a long history of use as herbal bitter in the treatment of digestive disorders and is an ingredient of many proprietary medicines. The bitter principles of gentian root are the secoiridoid glycosides amarogentin and gentiopicroin. Because of a long generative cycle (six to eight years until flowering), a low germination rate of seeds, as well as a very high variability of generatively produced plants, micropropagation may provide a useful alternative for producing plants with high glycoside content. Therefore the growth of axillary shoots was initiated on freshly grown shoots of greenhouse grown plants of *G. lutea* after sterilisation with ethanol (70%) for 5 m, Danchlorix (20%) for 5 m and HgCl₂ (0.2%) for 5 m. For shoot initiation and multiplication a modified MS-medium containing glucose (1.5%) and sucrose (1.5%), and a vitamine mixture from thiamine (0.3 mg·L⁻¹), L-tyrosine (100 mg·L⁻¹), adenine hemisulphate dehydrate (80 mg·L⁻¹) and ascorbic acid (200 mg·L⁻¹), gelrite (3 g·L⁻¹), pH 5.8 was used. Optimum benzyladenine and naphthalene acetic acid concentrations for shoot development were established and found to be 6 mg·L⁻¹ for BAP und 0.5 mg·L⁻¹ for NAA. Roots were induced by using WPM-medium with glucose (0.75%) and sucrose (0.75%), and IBA (0.2 g·L⁻¹).

Keywords

Gentian root, micropropagation, plant tissue culture, rooting, yellow gentian

Einleitung

Der Gelbe Enzian (*Gentiana lutea* L.) ist eine ausdauernde bis zu 120 Zentimeter hohe Staude mit einem runden, unverzweigten Stängel, die in den alpinen Gebieten Zentral- und Südeuropas heimisch ist (LANGE 1998). Als Droge Enzianwurzel, *Gentianae radix*, dienen die getrockneten, zerkleinerten, unterirdischen Pflanzenteile. Sie sind reich an Zuckern (z.B. Gentiobiose) und Bitterstoffen (Gentianopicroin und Amarogentin). Die Bitterstoffe dienen eigentlich als Schutz vor Tierfraß. Die Droge wird als Bittermittel, z.B.

als appetitanregender Magenbitter, Aperitif und für Schnaps verwendet. Der Gelbe Enzian wird auch als Fiebermittel benutzt; die Wirksamkeit gegen Fieber konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Es wird ein bitteres und verdauungsanregendes Tonikum gewonnen. Er wird eingesetzt gegen Müdigkeit, Untergewicht, Blutarmut und Appetitmangel in der Rekonvaleszenz (SCHÖPKE 2011). Aufgrund der langen Generationszeit, geringer Keimfähigkeit der Samen, sowie hoher Variabilität von generativ erzeugten Pflanzen bietet die Gewebekultur eine gute Alternative zur Erzeugung von inhaltsstoffreichen Pflanzen.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Die Mutterpflanzen von *G. lutea* (Wurzeln, Knollen) wurden in Sand angezogen. Nach dem Austreiben der ersten 2-3 cm erfolgte der Schnitt (*Abbildung 1*).

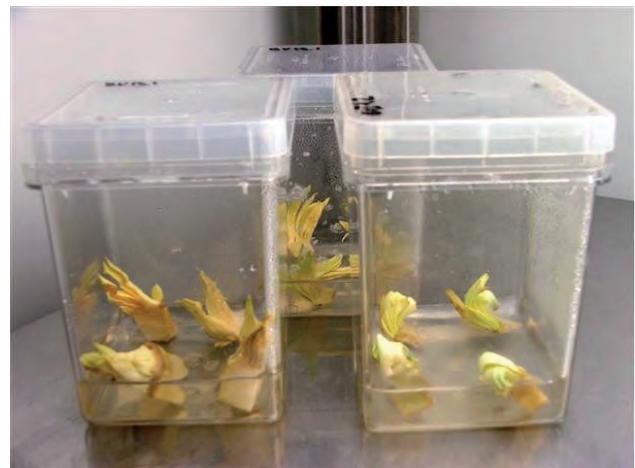


Abbildung 1: Frisch etablierte Gentiana lutea Kulturen

Figure 1: Freshly established in vitro micropropagation of Gentiana lutea

Sterilisation

Die Sterilisation erfolgte mit 70% Ethanol für 5 m, 20% Danchlor für 5 m und HgCl₂ (0,2%) für 5 m. Der Schnitt erfolgte so, dass das Hauptmeristem und die Meristeme der Blattanlagen an der Basis der Wurzel weiterwachsen konnten.

¹ Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

* Ansprechpartner: Elisabeth KOPPER, elisabeth.kopper@ages.at

Vermehrung und Bewurzelung

Die Vermehrung erfolgte auf Medium LV1 (Luteavermehrung) (Abbildung 2). Dies ist ein modifiziertes MS-Medium (MURASHIGE und SKOOG 1962) mit Glucose (1,5%) und Saccharose (1,5%), sowie einem Vitaminzusatz aus Thiamin ($0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), L-Tyrosin ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Adeninsulfat ($80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) und Ascorbinsäure ($200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Gelrite ($3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 5,8, sowie den Phytohormonen BAP ($6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), NAA ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) und Gibberellinsäure ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Nach ca. einem Monat wurden sterile Kulturen (Hauptexplantate) diametral geteilt und auf frisches Vermehrungsmedium gegeben. In der Folge wurde das Vermehrungsmedium folgendermaßen modifiziert (LV2). Die BAP-Konzentration auf $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ gesenkt, NAA auf $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ und auf die Gibberellinsäure wurde verzichtet. Zur Bewurzelung wurde ein WPM-Medium (LLOYD und McCOWN 1980) mit Glucose (0,75%) und Saccharose (0,75%), sowie IBA ($0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) verwendet.



Abbildung 2: *Gentiana lutea* auf Vermehrungsmedium LV
Figure 2: *Gentiana lutea* on LV medium (modified MS medium)

Inkubationsbedingungen und Transfer ins Glashaus

Die Kultivierung erfolgte im 16 h Tag bei 23°C . Zur Akklimatisierung wurden die bewurzelten Pflanzen in ein Gemisch aus Sand, Tennenrot, aufgedüngtem Torfkultursubstrat und Perlit gepflanzt und für drei Wochen in einem Inkubator mit hoher Luftfeuchte (80-90%) gehalten. Anschließend wurden die Pflanzen für 6 bis 8 Wochen im Glashaus kultiviert (Abbildung 3) und vor dem Auspflanzen im Freien abgehärtet.



Abbildung 3: *Gentiana lutea* im Glashaus
Figure 3: Regenerated *Gentiana lutea* plants in the greenhouse

Ergebnisse und Diskussion

Es ist allgemein bekannt, dass es sehr schwierig ist, *in vitro*-Kulturen von *Gentiana* Arten zu etablieren, da dafür eine sehr hohe Konzentration von Cytokinin erforderlich ist (LAMPROYE et al. 1987, HOSOKAWA et al. 1996). Aus diesem Grund wurde eine BAP-Konzentration von $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ gewählt (MOMČILOVIĆ 1997) und ein Vitaminzusatz, der zuvor bei der Kultur von Bananen erfolgreich erprobt worden war, angewendet. Dies führte zu einer erfolgreichen Vermehrung der Explantate. Bei der Verwendung von LV1 (BAP $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) entwickelten sich buschige Pflanzen mit mehreren dünnen Seitentrieben. Die Dauer einer Passage betrug ca. 6 Wochen. Die Vermehrungsrate pro Passage lag bei 6-8. Allerdings war es sofort nach der Verwendung von LV1 nicht möglich, die Pflänzchen zu bewurzeln. Schwierigkeiten bei der Bewurzelung von *G. lutea* sind auch aus der Literatur bekannt (LAMPROYE et al. 1987). Aus diesem Grund wurde eine weitere Passage auf Medium LV2 (BAP $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NAA $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) vermehrt und anschließend auf Bewurzelungsmedium umgesetzt.

Zur Bewurzelung wurden verschiedene Medien- und Auxinkonzentrationen erprobt (Daten nicht gezeigt). Schließlich erwies sich ein Woody Plant Medium (LLOYD und McCOWN 1980) mit Glucose (0,75%) und Saccharose (0,75%), sowie IBA ($0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) als erfolgreich.

Die Bewurzelungsrate lag bei ca. 75%. Dies stimmt mit den Bewurzelungsdaten von VIOLA und FRANZ 1989, überein. Bei der Verwendung von NAA als Auxin, konnten wir allerdings, im Gegensatz zu diesen, keine Bewurzelung erzielen. Bei der Kultivierung im Glashaus überlebten durchschnittlich 50 Prozent der Pflanzen. Bei einigen Chargen jedoch, die länger (bis zu 9 Wochen) auf dem Bewurzelungsmedium blieben, konnte eine Überlebensrate von 90 % beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es gelungen ist, eine effiziente *in vitro* Vermehrungsmethode für *G. lutea* zu

entwickeln, die in Zukunft für die Produktion von inhaltsstoffreichen *Gentiana lutea*-Klonen zur Verfügung steht.

Danksagung

Wir danken Herrn Rathbauer und seinem Team für die gärtnerische Betreuung der Pflanzen, sowie der Firma Bionorica SE, Neumarkt, für die Bereitstellung der Mutterpflanzen.

Literatur

- HOSOKAWA K, NAKANO M, OIKAWA Y, YAMAMURA S, 1996: Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivars of *Gentiana*. *Plant Cell Rep* 15: 578-581.
- LAMPROYE A, CREVECOEUR M, KEVERES C, GASPAR T, 1987: Multiplication végétative *in vitro* de *Gentiana lutea* et de *Gentiana pneumonante*. *Med Fac Landbouw Rijksuniv Gent* 52: 1255-1257.
- LANGED, 1998: Europe's medicinal and aromatic plants: Their use, trade and conservation. *Traffic Int*, Cambridge.
- LLOYD G, McCOWN B, 1980: Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc Int Plant Prop Soc* 30: 421-427.
- MOMČILOVIĆ I, GRUBIŠIĆ D, NEŠKOVIĆ M, 1997: Micropropagation of four *Gentiana* species (*G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* and *G. acaulis*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 49: 141-144.
- MURASHIGE T, SKOOG F, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- SCHÖPKE T, 2011: Enzianwurzel - *Gentianae radix* [Ph. Eur. 7.0 (01/2008: 0392)]. *Arzneipflanzenlexikon*, Institut für Pharmazie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. [Available online: http://www.pharmakobotanik.de/systematik/6_droge/gentia-r.htm; accessed 10 Jan 2012]
- VIOLA U, FRANZ C, 1989: *In vitro* propagation of *Gentiana lutea*. *Planta Med* 55: 690.

Anmerkung: Die Online-Version des Tagungsbandes enthält alle Abbildungen in Farbe und kann über die Homepage der Jahrestagung (<http://www.raumberg-gumpenstein.at/> - Downloads - Fachveranstaltungen/Tagungen - Saatzüchtertagung - Saatzüchtertagung 2011) oder den korrespondierenden Autor bezogen werden.

Marker assisted breeding for improving Fusarium head blight resistance in wheat

Hermann Buerstmayr^{1*}, Aziz Salameh^{1,2}, Maria Buerstmayr¹,
Barbara Steiner¹, Anton Neumayer³ and Marc Lemmens¹

Abstract

Breeding for Fusarium head blight (FHB) resistance of wheat is a continuous challenge for plant breeders. Resistance to FHB is a quantitative trait, governed by several to many genes and modulated by environmental conditions. QTL for FHB resistance have been detected on virtually all wheat chromosomes, but only a few have been validated so far for their usefulness in breeding (BUERSTMAYR et al. 2009). The presented study was undertaken to assess the effect on improving FHB resistance of two resistance QTL, i.e. *Fhb1* and *Qfhs.ifa-5A*, from the CIMMYT spring wheat line CM-82036 when transferred by marker assisted back-crossing in European winter wheat. To achieve these goals we developed and evaluated 15 BC2 derived families based on 9 European winter wheat varieties as recipients and the FHB resistant line CM-82036 as resistance donor. Winter wheat back-cross lines with one QTL from the resistant donor showed

a clear tendency towards increased FHB resistance. On average lines with *Fhb1*+*Qfhs.ifa-5A* were only slightly more resistant compared to lines with *Fhb1* alone. The obtained results suggest that the effect of the spring wheat derived QTL on improving FHB resistance increases in the order *Qfhs.ifa-5A*<*Fhb1*≤*Qfhs.ifa-5A*+*Fhb1*. The genetic background of the recipient line had huge impact on the resistance level of the obtained lines. No systematic negative effect of the spring wheat derived QTL on grain yield, thousand grain weight, hectolitre weight and protein content was found. The use of spring wheat derived FHB resistance QTL for breeding high yielding cultivars with improved FHB resistance appears therefore highly promising. For more details see SALAMEH et al. (2011).

Keywords

Fusarium head blight, QTL performance, resistance breeding, *Triticum aestivum*

References

- BUERSTMAYR H, BAN T, ANDERSON JA, 2009: QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breed* 128: 1-26.
- SALAMEH A, BUERSTMAYR M, STEINER B, NEUMAYER A, LEMMENS M, BUERSTMAYR H, 2011: Effects of introgression of two QTL for Fusarium head blight resistance from Asian spring wheat by marker-assisted backcrossing into European winter wheat on Fusarium head blight resistance, yield and quality traits. *Mol Breed* 28: 485-494.

Note: A similar contribution was presented at the 11th European Fusarium Seminar, Radzikow, 20-24 Sep 2010, at the US Fusarium Head Blight Forum, Milwaukee, 7-9 Dec 2010 and the 21st ITMI Workshop, Mexico, 5-9 Sep 2011.

¹ BOKU - University of Natural Resources and Life Sciences Vienna, Department IFA-Tulln, Institute for Biotechnology in Plant Production, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

² Hebron University, Hebron, Palestine

³ Saatzucht Donau GmbH & Co KG, A-4981 Reichersberg am Inn 86, Austria

* Ansprechpartner: Hermann BUERSTMAYR, hermann.buerstmayr @boku.ac.at

Molecular mapping of resistance to Fusarium head blight in tetraploid wheat

Karin Huber, Abdallah Issam Alimari, Johannes Heckmann, Maria Buerstmayr,
Marc Lemmens, Barbara Steiner and Hermann Buerstmayr^{1*}

Abstract

While many reports on genetic analysis of Fusarium head blight (FHB) resistance in bread wheat have been published during the past decade, only limited information is available on FHB resistance derived from tetraploid wheat so far. In this contribution we report about genetic analysis of FHB resistance derived from two tetraploid *Triticum* sources: (1) *Triticum dicoccum* (cultivated emmer), and (2) *T. dicoccoides* (wild emmer). Backcross derived recombinant inbred line populations were developed from crosses of the resistance donors with adapted *T. durum* cultivars. The populations were evaluated for FHB response in well replicated experiments with artificial inoculation in the greenhouse (*T. dicoccoides*) or field (*T. dicoccum*). The same lines were genetically

analysed using SSR and AFLP markers. Map construction based in the backcross derived RIL populations was done with CarthaGène (DE GIVRY et al. 2004) and QTL mapping in QGene (NELSON 1997). Several QTL were identified. In the *T. dicoccum* populations the largest QTL mapped to chromosome 4B, overlapping with the semi-dwarf gene Rht-B1. In the *T. dicoccoides* accession Mt. Gerizim #36 significant QTL for resistance to fungal spreading (type 2 resistance) were detected on chromosomes 3A and 6B. These resistance QTL should be useful especially in durum wheat improvement.

Keywords

Fusarium head blight, marker assisted resistance breeding, QTL mapping, tetraploid wheat

Acknowledgments

We acknowledge funding of this work by FWF (Austrian Science Fund), project number: 17310-B05. Abdallah Alimari was supported by a North-South Dialogue grant, funded by the Austrian Ministry of Foreign Affairs and managed by the Austrian Academic Exchange Service (OEAD). We acknowledge Clare Nelson (Kansas State University, USA) for modifying the CarthaGène program to facilitate map construction from an advanced back-cross population.

References

- DE GIVRY S, BOUCHEZ M, CHABRIER P, MILAN D, SCHIEX T, 2005: Multipopulation integrated genetic and radiated hybrid mapping. *Bioinformatics* 21: 1703-1704.
- NELSON JC, 1997: QGENE: Software for marker-based genomic analysis and breeding. *Mol Breed* 3: 239-245.
- Note: A similar contribution was presented at the 11th European Fusarium Seminar, Radzikow, 20-24 Sep 2010, at the US Fusarium Head Blight Forum, Milwaukee, 7-9 Dec 2010.

¹ BOKU - University of Natural Resources and Life Sciences Vienna, Department IFA-Tulln, Institute for Biotechnology in Plant Production, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

* Ansprechpartner: Hermann BUERSTMAYR, hermann.buerstmayr @boku.ac.at

Expression-QTL mapping in wheat to identify genes involved in resistance to *Fusarium graminearum*

Mina Samad-Zamini¹*, Wolfgang Schweiger, Erik Sam, Gerald Siegwart, Barbara Steiner, Marc Lemmens and Hermann Buerstmayr

Abstract

Fusarium head blight (FHB) caused by *Fusarium graminearum* frequently leads to large yield losses in wheat and other cereals but also reduces quality due to contamination with mycotoxins. Breeding for resistance against the disease in wheat provides the best means to protect yields. In the present study, we aim to identify genes which are differentially expressed in response to *Fusarium* in wheat. Therefore, we employ 200 doubled haploid lines and the two parents (the resistant line CM82036 and the susceptible European spring wheat cultivar Remus) in an expression quantitative trait loci (eQTL) mapping experiment using microarray technology. Expression QTL starts with generating a genetic map using differentially expressed genes between lines as molecular markers to identify genomic regions involved in *Fusarium* resistance. Microarrays allow to measure differential transcript abundance by detecting fluorescent emission of labeled-mRNA hybridized to complementary probe sets. We used a custom-build Agilent-microarray

to identify genes differentially regulated under varying experimental conditions (e.g. time, genotype, *Fusarium* vs. water inoculation). Our array-design allows to detect 44000 wheat genes, several hundred wheat candidate genes that have been reported upregulated in response to *Fusarium* stress in literature and the entire transcriptome of *Fusarium graminearum* (ca. 14000 genes). In total, we aim to hybridize about 400 microarrays. Once finished, we are able to compare and correlate the genetic map derived from conventional QTL analysis with the new eQTL map. We expect to identify new QTL involved in *Fusarium* resistance that encode for resistance genes or regulative hotspots controlling multiple genes not encoded on the eQTL. Such hotspots and the related genes cannot be detected by conventional QTL mapping and enables us to build biochemical pathways that are relevant for resistance against *Fusarium*.

Keywords

Expression QTL, microarray, QTL analysis, transcript abundance

References

- BUERSTMAYR H, STEINER B, HARTL L, GRIESSER M, ANGERER N, LENGAUER D, MIEDANER T, SCHNEIDER B, LEMMENS M, 2003: Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theor Appl Genet* 107: 503-508.
- CHEUNG VG, SPIELMAN RS, 2009: Genetics of human gene expression: mapping DNA variants that influence gene expression. *Nature Rev Genet* 10: 595-604.
- KLIEBENSTEIN D, 2009: Quantitative genomics: analyzing intraspecific variation using global gene expression polymorphisms or eQTL. *Ann Rev Plant Biol* 60: 93-114.

¹ BOKU - University of Natural Resources and Life Sciences Vienna, Department IFA-Tulln, Institute for Biotechnology in Plant Production, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

* Ansprechpartner: Mina SAMAD-ZAMINI, mina.zamini@boku.ac.at

Reconstruction and cloning of wheat UDP-glucosyltransferases with the putative ability to inactivate the *Fusarium* toxin deoxynivalenol

Andreas Teutschl¹, Wolfgang Schweiger^{1*}, Gerald Siegwart¹, Erik Sam¹, Barbara Steiner¹,
Hermann Bürstmayr¹, Marc Lemmens¹ and Gerhard Adam²

Abstract

Fusarium graminearum frequently infects wheat and barley causing severe contamination of the harvested material with mycotoxins, such as deoxynivalenol (DON). Wheat lines harboring the *Fhb1* resistance QTL have been shown to accumulate higher levels of the non-toxic DON-3-glucoside (LEMMENS et al. 2005). The compound is generated by the activity of UDP-glucosyltransferases (UGT), which consequently have been implicated with playing a role in the resistance of wheat and other plants to *Fusarium* head blight. Previous transcriptomic studies in our group have led to the identification of 16 candidate UGT genes in wheat that are specifically upregulated in response to *Fusarium* stress. Among them we identified a UGT gene (Ta.12887.1.S1) which is a close homolog to a UGT gene from barley, which was shown to exhibit the ability to transform DON into DON-3-glucoside (SCHWEIGER et al. 2010). Another candidate UGT (Ta.22565.1.S1) is closely related to the *Arabidopsis* UGT73C5 gene, which also accepts DON as substrate. The group of upregulated UGTs comprises also a gene (EX982036) similar to a UGT previously identified by STEINER et al. (2009) in a wheat cDNA-AFLP analysis. As probe sets from microarrays derive from expressed sequence tags (ESTs) whose sequence

is not fully known, the starting point of our work was to reconstruct the full-length genes for subsequent cloning. For this purpose we have employed the Unigene-EST databases provided by NCBI and TIGR, public resources for large-scale plant gene expression such as Plexdb and next sequencing data from the UK wheat sequencing project (<http://www.cerealsdb.uk.net/>). We managed to reconstruct Ta.22565.1.S1 and EX982036 in silico, PCR-amplified both genes and cloned into a pGEM-T-easy cloning vector. Ta.22565.1.S1 was subcloned into a yeast expression to transform toxin-sensitive yeast strains and test the transformed strains for enhanced resistance against DON. These tests have not been performed yet. Capturing Ta.12887.1.S1 so far has been unsuccessful as the N-terminal region of the gene harbors a large GC-rich region, which complicates cloning of the gene. Also the hexaploid nature of wheat makes it extremely difficult to distinguish targets whose sequence is only partially known from homoealleles. To speed up our tests Ta.12887.1.S1 was ultimately custom synthesized and is currently tested in yeast.

Keywords

Deoxynivalenol, *Fusarium*, UDP-glucosyltransferases, wheat

References

- LEMMENS M, SCHOLZ U, BERTHILLER F, DALL'ASTA C, KOUTNIK A, SCHUHMACHER R, BUERSTMAYR H, MESTERHAZY A, KRŠKA R, RUCKENBAUER P, 2005: The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Mol Plant-Microbe Interact* 18: 1318-24.
- SCHWEIGER W, BODDU J, SHIN S, POPPENBERGER B, BERTHILLER F, LEMMENS M, MUEHLBAUER GJ, ADAM G, 2010: Validation of a candidate deoxynivalenol-inactivating UDP-glucosyltransferase from barley by heterologous expression in yeast. *Mol Plant-Microbe Interact* 23: 977-986.
- STEINER B, KURZ H, LEMMENS M, BUERSTMAYR H, 2009: Differential gene expression of related wheat lines with contrasting levels of head blight resistance after *Fusarium graminearum* inoculation. *Theor Appl Genet* 118: 753-64.

¹ BOKU - University of Natural Resources and Life Sciences Vienna, Department IFA-Tulln, Institute for Biotechnology in Plant Production, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

² BOKU - University of Natural Resources and Life Sciences Vienna, Department of Applied Genetics and Cell Biology, Konrad Lorenz Straße 24, A-3430 TULLN

* Ansprechpartner: Wolfgang Schweiger, wolfgang.schweiger@boku.ac.at

QTL mapping of adult plant leaf rust and stripe rust resistance derived from the Austrian winter wheat cultivar Capo

Lydia Matiasch^{1*}, Maria Buerstmayr¹, Katharina Herzog¹, Ján Kraic², Valéria Šudyová², Svetlana Šliková², Franziska Löschenberger³, Marion Marn³, Julia Lafferty³, Marianna Ittu⁴, Gyula Vida⁵, Fabio Mascher⁶, Lorenz Hartl⁷, Kerstin Flath⁸ and Hermann Buerstmayr¹

Abstract

Leaf rust caused by *Puccinia triticina* is among the most prevalent leaf diseases of wheat worldwide. The Austrian cultivar Capo possesses quantitative and durable adult plant leaf rust resistance, but does not possess any effective major *Lr* gene to our knowledge. We developed and tested three recombinant inbred line populations: Capo×Isengrain, Capo×Furore and Capo×Arina for adult plant leaf rust resistance in well replicated field experiments over locations and years under high disease pressure. In addition, the Capo×Furore population was tested for stripe rust (*P. striiformis*) resistance. In parallel the three populations were genetically fingerprinted with molecular markers (SSR, AFLP and DArT). We genotyped and genetically mapped at least 620 polymorphic markers per population. We calculated linkage maps of all three populations and detected quantitative trait loci

(QTL) for leaf rust resistance. Highly significant Capo derived QTL for leaf resistance were located on chromosomes 2A, 2B and 3B, supporting the hypothesis of quantitative rust resistance in this cultivar. Interestingly in the Capo×Isengrain population the strongest QTL derived from the susceptible parent (Isengrain) and mapped to chromosome 7B, corresponding most likely to the gene *Lr14a*. In addition we found two major QTL for stripe rust resistance in the Capo×Furore population on chromosomes 2B and 3B. The obtained results will be useful for selection and breeding of new cultivars with durable adult plant resistance to leaf rust and stripe rust.

Keywords

Puccinia striiformis, *Puccinia triticina*, QTL mapping, resistance breeding, *Triticum aestivum*

Acknowledgments

This work is funded by the Austrian Science Fund (FWF), project number L182-B06 with additional support from the European Union: INTERREG IIIA Austria-Slovakia (EFRE co-financing) and the government of Lower Austria.

Note: A similar contribution was presented at the 21st ITMI Workshop, Mexico, 5-9 Sep 2011.

¹ BOKU - University of Natural Resources and Life Sciences Vienna, Department IFA-Tulln, Institute for Biotechnology in Plant Production, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

² Institute of Plant Production, SK-92168 PIEŠŤANY

³ Saatzucht Donau, A-2301 PROBSTDORF

⁴ National Agricultural Research-Development Institute, RO-915200 FUNDULEA

⁵ Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, H-2462 MARTONVASAR

⁶ Station de Recherche Agroscope, CH-8820 CHANGINS-WÄDENSWIL

⁷ Bavarian State Institute for Agriculture, D-85356 FREISING

⁸ Julius Kühn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, D-38100 BRAUNSCHWEIG

* Ansprechpartner: Hermann Buerstmayr, hermann.buerstmayr@boku.ac.at

