

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

Dörthe Musmann<sup>1</sup>, Eike Lornsen<sup>1</sup>, Gisela Jansen<sup>2</sup>, Matthias Enders<sup>3</sup>, Barbara Kusterer<sup>4</sup>, Hans-Ulrich Jürgens<sup>2</sup>, Frank Ordon<sup>2</sup>, Andrzej Kilian<sup>5</sup>, Franz-Joachim Fromme<sup>4</sup>, Peter Wehling<sup>1</sup> und Bernd Hackauf<sup>1\*</sup>

### 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

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

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

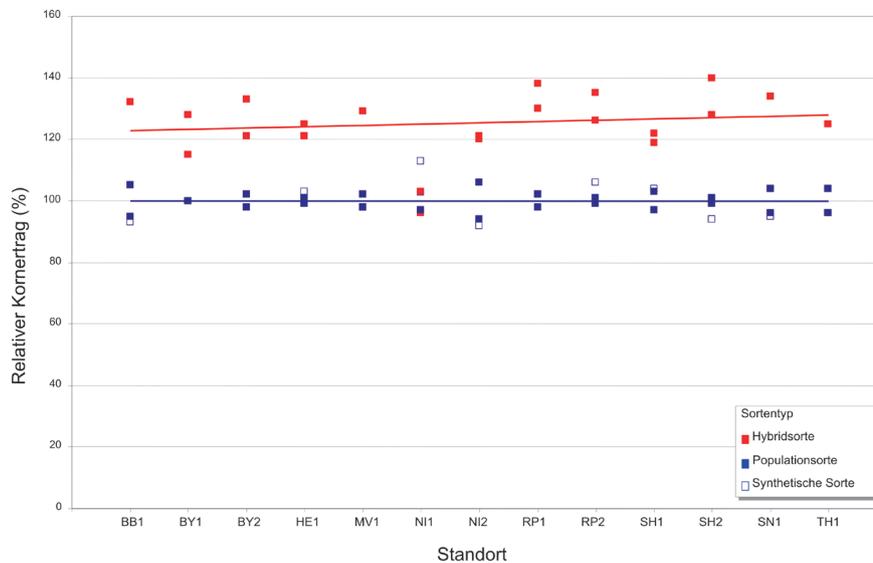
<sup>3</sup> Julius Kühn-Institut, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Erwin-Baur-Straße 27, D-06484 QUEDLINBURG

<sup>4</sup> HYBRO Saatzeit GmbH & Co. KG, Kleptow 53, D-17291 SCHENKENBERG

<sup>5</sup> 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; MASOJC und MILCZARSKI 2005, FALKE et al. 2009). Diese QTL-Studien wurden an Kartierungspopulationen aus biparentalen Kreuzungen (F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub>, 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 Kandidatengenen, 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 ( $\alpha$ -Design) in 5m<sup>2</sup> 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 3130×1 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
$\sigma_G^2$	13,39*	3,37*
$\sigma_O^2$	141,78*	2,75*
$\sigma_{G \times O}^2$	8,57*	0,35*
$\sigma_F^2$	19,25	2,82
$\hat{H}^2$	0,88	0,68

\* signifikant bei  $\alpha=0,05$

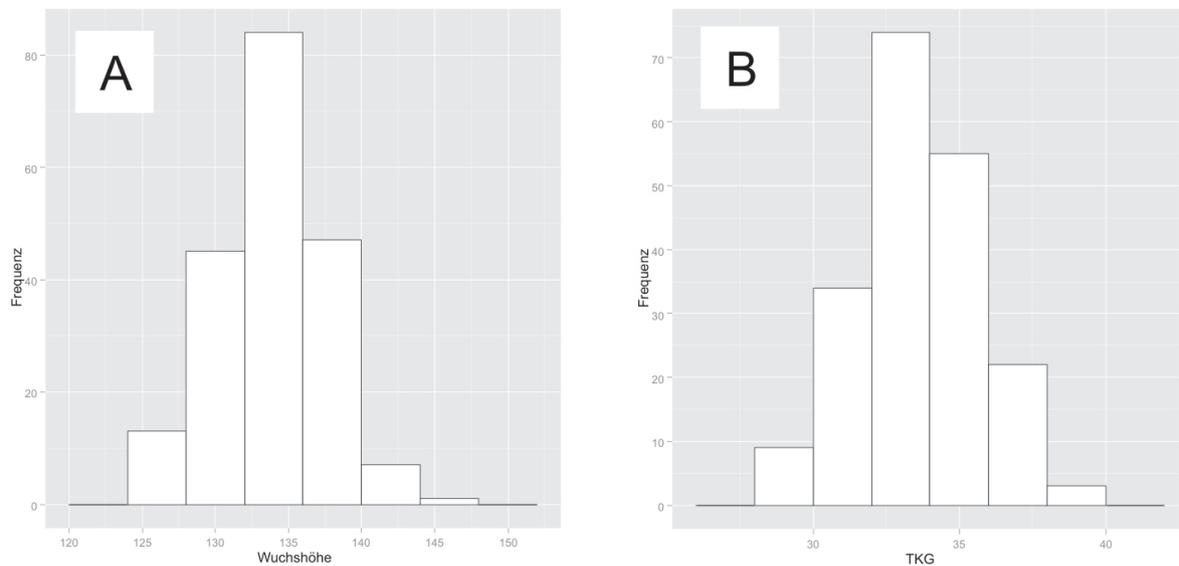


Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung für die Merkmale Wuchshöhe (A) und Tausendkornmasse (B) von 197 Testkreuzungen über multiple Umwelten in 2010

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

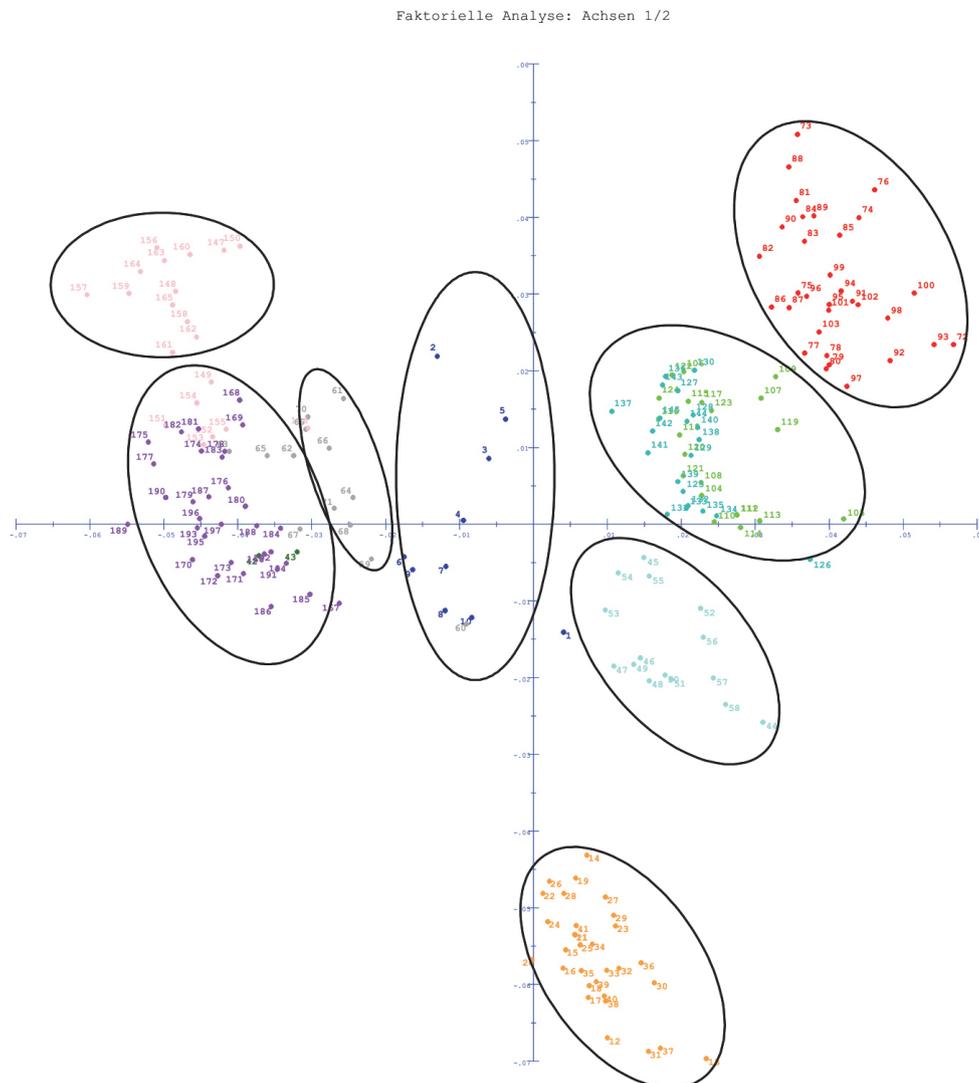
Table 2: Proportion of phenotypic variance ( $V_p$ ) for plant height (WUH, cm) and thousand grain weight (TKG, g) explained by associated markers in case of three significance levels

	$\alpha=0,05$		$\alpha=0,01$		$\alpha=0,001$	
	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

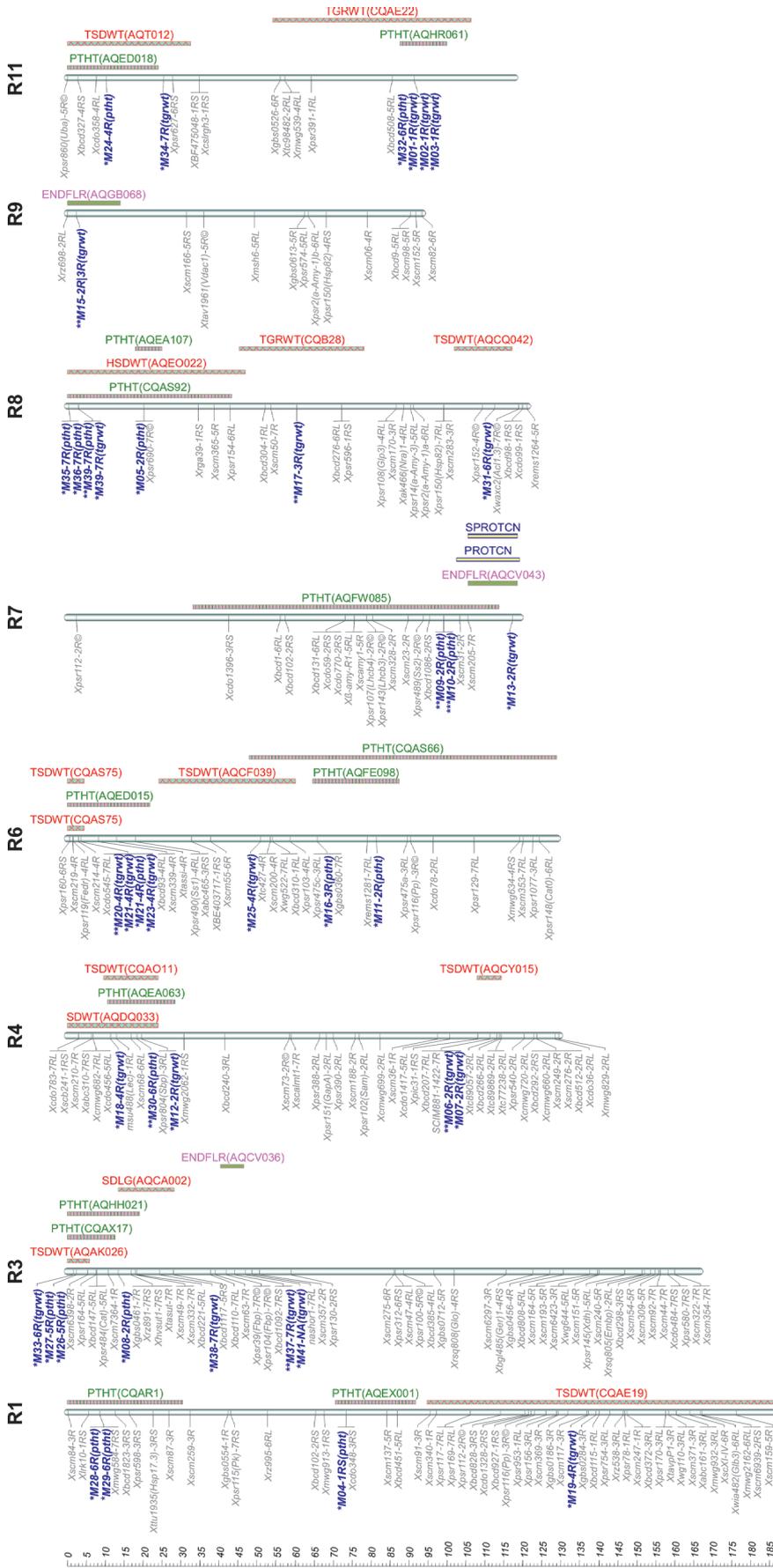


**Abbildung 3: Hauptkoordinatenanalyse von 197 Testkreuzungen.** Eine Einteilung des Untersuchungsmaterials in Populationen basierend auf genetischen Unterschieden wurde mit Hilfe von 3117 DArT-Markern vorgenommen. Der durch diese Darstellung erklärte Anteil an der Gesamtvarianz beträgt 18%.

**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%.

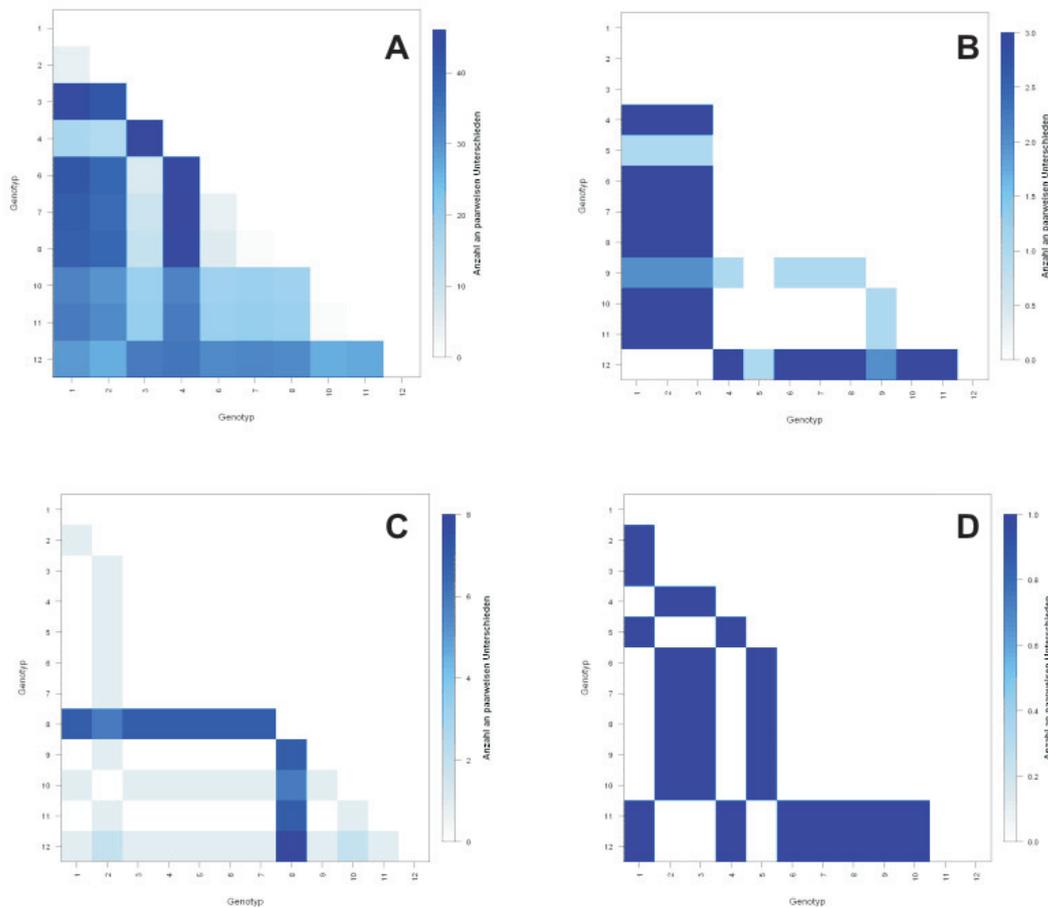
(Abbildung 4). Homologe QTL-Regionen für Wuchshöhe, Korngröße, Reife- und Blütezeitpunkt wurden bereits früher zwischen verschiedenen Arten aus der Familie der Süßgräser (Reis, Mais, Hirse, Gerste und Weizen) beschrieben (LIN et al. 1995, PATERSON et al. 1995). Die Integration relevanter Daten über komplex 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 (PTHT: plant height; HSDWT: hundred seed weight; TGRWT: thousand grain weight; TSDWT: thousand seed weight; SDLG: seed length; PROTCN: total protein content; SPROTCN: 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).

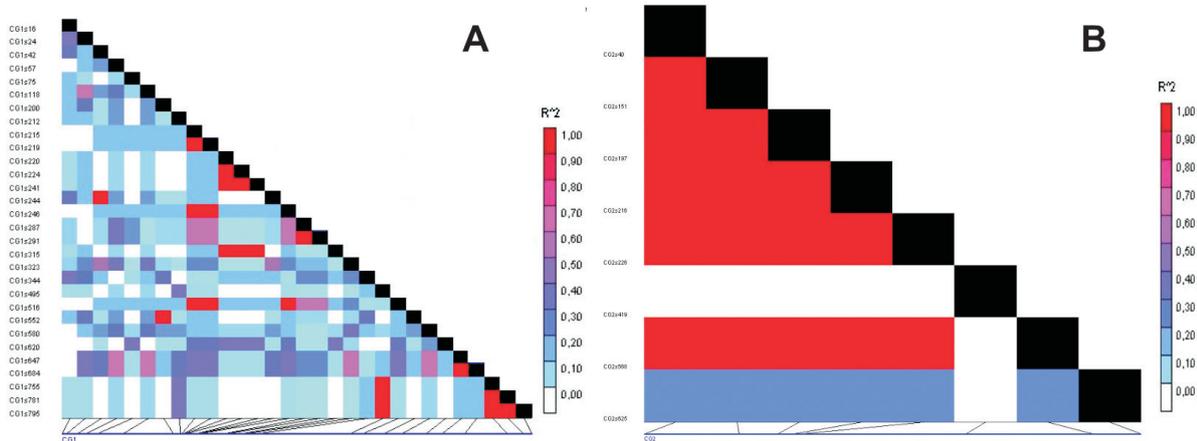
Einfluss auf das Merkmal Kornmasse besitzt (ASHIDA et al. 2009). Für qualitative Merkmale des Roggens haben sich genomische Informationen aus evolutionär verwandten Gräsern als wertvolle Ressource bei der Entwicklung molekularer Marker erwiesen (HACKAUF und WEHLING 2005, MAGO et al. 2005, COLLINS et 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](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-USZYNSKA K, 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.
- ZHUM, 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.