

Nutzung von Wildgerstenmaterial in der Gerstenzüchtung

A. ZACHARIAS, K. PILLEN und J. LEON

Einleitung

Die Verbesserung von quantitativen Merkmalen bei landwirtschaftlichen Kulturpflanzen, wie z.B. Ertrag und Qualität, beruhte bisher fast ausschließlich auf der Neukombination von Genen bzw. Allelen innerhalb der Hochleistungsorten. Die Einkreuzung von Wildformen wird außer in der Resistenzzüchtung kaum genutzt, da Wildformen gerade im Hinblick auf die Verbesserung quantitativer Merkmale viele negative Eigenschaften im Vergleich zu den heutigen Zuchtformen besitzen. Eine Bewertung des genetischen Potentials der Wildformen im Hinblick auf die Verbesserung von Hochleistungseltern ist von züchterischem Interesse, um eine mögliche Einschränkung der genetischen Diversität zwischen den heute vorkommenden Kultursorten zu verhindern.

Mit Hilfe der Strategie der AB-QTL-Analyse (Advanced Backcross Quantitative Trait Locus Analysis), welche von TANKSLEY und NELSON (1996) entwickelt wurde, sollen Wildformgene für die Züchtung nutzbar gemacht werden. Die Strategie beruht darauf, daß vorteilhafte QTL-Allele der Wildformen vor dem genetischen Hintergrund eines Hochleistungselters identifiziert und anschließend über die Stufe der NILs (Nahe Isogene Linien) in der Kulturform stabilisiert werden können. Bei der Durchführung einer AB-QTL-Analyse wird nicht in der F_2 -Population mit der Evaluierung der quantitativen Merkmale begonnen, sondern es wird zuvor zweibis dreimal mit dem Kulturelter zurückgekreuzt. Durch die Einschränkung des Genomanteils des Wildelters können in jeder einzelnen Linie der Rückkreuzungspopulation Merkmale wie z.B. Ertrag oder Qualität besser erfaßt werden, da sowohl unerwünschte Allele der Wildformen, als auch epistatische Gen-Effekte reduziert werden.

Wie in der *Abbildung 1* dargestellt, ist bereits in der BC_2 der Wildgerstenanteil am Gesamtgenom auf durchschnittlich 12,5 % reduziert und es ist daher möglich bereits in dieser Stufe eines Rückkreuzungsprogrammes auf Ertrags- bzw. Qualitätsmerkmale zu bonitieren. Es ist jedoch wichtig einen möglichst großen Anteil des Wildformgenoms in der gesamten Population zu erhalten, um mögliche positive Gen-Effekte nicht zu verlieren. Daher ist in den einzelnen Rückkreuzungsstufen nur eine milde Selektion durchzuführen. Mittels molekularer Marker wird die Genotypisierung der Rückkreuzungspopulation durchgeführt. So können DNA-Segmente identifiziert werden, welche einen signifikanten Beitrag für das untersuchte quantitative Merkmal zeigen. Erste erfolgreiche Anwendungen der AB-QTL-Analyse liegen

für Tomate (TANKSLEY et al. 1996, FULTON et al. 1997) und Reis (XIAO et al. 1997) vor. XIAO et al. (1997) konnten z.B. in einer Arbeit mit Hybridreis, den Ertrag des verwendeten Hochleistungselters durch die Einkreuzung von Wildformallelen um 18 % steigern. Im Bereich der Tomatenzüchtung konnte FULTON et al. (1997) mit der Einkreuzung der Wildform *Lycopersicon esculentum* den Ertrag um 34 % bzw. das Fruchtgewicht um 46 % erhöhen.

Die vorliegende Arbeit dient dem Ziel, QTLs aus der Gerstenwildform *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* (Linie ISR 101-23) in zwei BC_2F_2 -Populationen zu identifizieren, welche gegenüber den rekurrenten Kultureltern (Sommergerstensorten Apex bzw. Harry) einen merkmalssteigernden bzw. positiven Effekt aufweisen.

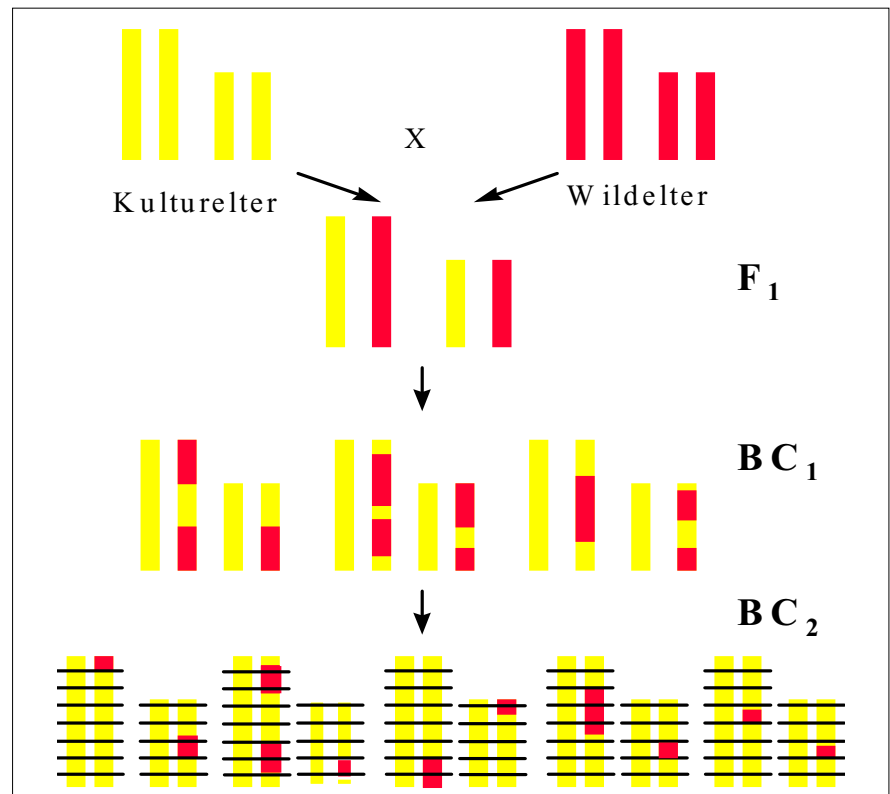


Abbildung 1: Rückkreuzungsschema einer AB-QTL-Analyse mit Genotypisierung in der BC_2 (GANAL, 1998)

Autoren: Dipl.Ing. Arndt ZACHARIAS, K. PILLEN und J. LEON, Institut für Pflanzenbau der Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität Bonn, Professur für Speziellen Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Katzenburgweg 5, D-53115 BONN

Tabelle 1: Übersicht über bisher veröffentlichte AB-QTL-Analysen bei den Kulturformen Reis und Tomate

Kulturform	Wildform	QTL-Effekte	Quelle
Reis	<i>Oryza rufipogon</i>	Ertrag: + 18%	Xiao et al. 1996
Tomate	<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	Ertrag: + 17%	Tanksley et al. 1996
Tomate	<i>Lycopersicon peruvianum</i>	Fruchtgewicht: + 14%	Fulton et al. 1997
Tomate	<i>Lycopersicon hirsutum</i>	Ertrag: + 34%	
		Fruchtgewicht: + 46%	
		Ertrag: + 15%	Bernacchi et al. 1998

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Für die Erhebung der phänotypischen Daten standen zwei Rückkreuzungspopulationen zur Verfügung. Als Kulturrelter bzw. auch als rekurrenter Elter wurden die Sommergersten Sorten Harry bzw. Apex ausgewählt. Die Wildform ISR 101-23 stellte in beiden Kreuzungspopulationen die Donorpflanze dar, welche aus Kisalon in Israel stammt (FISCHBECK et al. 1976). In der Apex-Kreuzungspopulation stehen 136 BC₂F₂-Pflanzen, in der Harry-Population 164 BC₂F₂-Pflanzen zur Verfügung. Die Erstellung der beiden genannten Rückkreuzungspopulationen erfolgte am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität zu Kiel.

Die Untersuchung der genetischen Abstände der verwendeten Marker erfolgt an 94 F₂-Pflanzen, welche auf die Kreuzung der Kulturgerste Apex mit der Wildgerste ISR 101-23 zurückgehen. Das Saatgut der geprüften Linien stammte jeweils aus dem Erntegut einer Handerte, um Vermischungen zu vermeiden.

Durchführung der Phänotypisierung

Die Phänotypisierung erfolgte an den BC₂F₂ abgeleiteten Linien in BC₂F₃, BC₂F₄ und BC₂F₅ der beiden Rückkreuzungspopulationen. Die Feldversuche wurden dreijährig auf dem Versuchsgut Dikopshof der Universität Bonn in Köln-Wesseling mit je drei Wiederholungen pro Linie durchgeführt. Als Versuchsanlage diente in den ersten beiden Jahren die Blockanlage, im Versuchsjahr '99 wurde die Randomisierung der einzelnen Linien dahingehend eingeschränkt, daß eine Sortierung in Bezug auf die Wuchshöhe der einzelnen Linien vorgenommen wurde. Dies sollte die Beeinflussung sehr großwüchsiger Linien auf die Nachbar-

parzelle minimieren. Die Randomisierung wurde mit der Software Alpha+ von WILLIAMS und TALBOT (1993) durchgeführt. Pflanzenproben wurden zu den Terminen Bestockung (EC 25), Blüte (EC 65) und Vollreife (EC 90) gezogen und anschließend die Trockenmasse (TM) festgestellt. Anhand dieser Ergebnisse konnten die physiologischen Merkmale der einzelnen Genotypen im Hinblick auf vegetative und generative Wachstumsraten bestimmt werden. Während der Vegetationsperiode wurden die Merkmale Pflanzenhöhe, Ährenlänge und zum Erntetermin dann die folgenden Merkmale bestimmt: Biomasse pro Pflanze, Ähren pro Pflanze, Körner pro Ähre, Tausendkorngewicht und Kornertrag pro Pflanze.

Durchführung der Genotypisierung

Zur Genotypisierung der beiden Rückkreuzungspopulationen werden hauptsächlich Mikrosatelliten (WEISSENBACH et al. 1992) verwendet. Bei den Sequenzen handelt es sich größtenteils um veröffentlichte Sequenzen (BEKKER und HEUN 1995, LIU et al. 1996, RUSSEL et al. 1997, STRUSS und PLIESKE 1998, WAUGH et al. im Druck). Es stehen jedoch auch aus eigenen Recherchen in der EMBL-Genbank Primerkombinationen zur Verfügung, welche mit der Software Primer3 von ROZEN und SKALESKY ([genome.wi.mit. du/cgi-bin/primer/primer3.cgi\) ermittelt worden sind.](http://www-</p>
</div>
<div data-bbox=)

In der Apex-Rückkreuzungspopulation stehen zusätzlich 12 AFLP-Marker zur Verfügung, welche auf die Primerkombinationen E37/M33 und E46/M32 zurückgehen.

Die Auftrennung der amplifizierten Banden erfolgt je nach Fragmentgröße in 6 bzw. 8 %igen Polyacrylamidgelen, bei 90 Watt. Die Anfärbung der Gele erfolgte mittels Silbernitrat (Promega, Mannheim). Es standen in der Apex-Population 60 Marker und in der Harry-Population 30 Marker zur Verfügung. Für die Untersuchung der Bedeutung des genetischen Hintergrundes standen für die beiden Kreuzungspopulationen 15 gemeinsame Marker zur Verfügung.

Die genetischen Abstände der in den Rückkreuzungspopulationen verwendeten Marker wurden in einer F₂-Population der Kreuzung Apex x ISR 101-23 bestimmt. Die ermittelten genetischen Abstände werden anschließend auch für die Intervallanalyse der Harry-Population verwendet, da keine wesentlichen Unterschiede in der Reihenfolge bzw. in den Abständen zwischen den beiden F₂-Populationen ermittelt werden konnten.

Datenanalyse und Detektion der QTLs

Die Berechnung der QTLs wird mit dem Software Programm Q-Gene 2.30 von NELSON (1997) durchgeführt. Die bisherigen Ergebnisse der QTL-Analyse beziehen sich auf eine Lineare Regressionsrechnung (single-point-analyse) von Phänotyp auf Marker, da eine abschließende Bestimmung der genetischen Abstände der verwendeten Marker noch nicht vorliegt. Als Signifikanzniveau für die Detektion eines QTLs wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\mu < 0,001$ festgelegt.

Tabelle 2: Anzahl lokalisierter QTLs der Merkmale Pflanzenhöhe, Ährenlänge, Karyopsen pro Ähre, TKG, Kornertrag pro Pflanze und generativer Wachstumsrate. Irrtumswahrscheinlichkeit: P<0,001

Population	Jahr	Anzahl insgesamt gefundener QTLs	positive QTLs der Wildgerste
Apex	1997	13	5
	1998	15	3
	1999	8	1
Harry	1997	31	7
	1998	45	11
	1999	34	6

Tabelle 3: Darstellung der Effekte auf die Merkmalsausprägung, in der Harry-Rückkreuzungspopulation, detektiert durch vier verschiedene Mikrosatelliten-Marker (A = Kulturelterallel, a = Wildelateral, δ = senkender Effekt, \bar{n} = erhöhender Effekt)

Merkmale	Mikrosat.	Effekt auf die Merkmalsausprägung der Genotypklassen	
		AA	aa
Pflanzenhöhe	MGB 47	δ	\bar{n}
Ährenlänge	MGB 52	δ	\bar{n}
Karyopsen/Ähre	MGB 46	\bar{n}	δ
Kornertrag/Pfl.	MGB 173	\bar{n}	δ

Tabelle 4: Darstellung der Merkmalsausprägungen bei MGB 47 in der Harry-Rückkreuzungspopulation

Signifikanzschwellen: n.s. = nicht signifikant, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ und *** = $P < 0,001$; $\bar{\delta}$ Harry = Mittel der Sorte Harry; $\bar{\delta}$ Pop% = $\bar{\delta}$ Pop.*100/ $\bar{\delta}$ Harry, AA% = AA*100/ $\bar{\delta}$ Harry, Aa% = Aa*100/ $\bar{\delta}$ Harry, aa% = aa*100/ $\bar{\delta}$ Harry; $\bar{\delta}$ Pop., AA, Aa, aa = Mittel der Kreuzungspopulation bzw. der Genotypklassen

Merkmal	Jahr	$\bar{\delta}$ Harry	$\bar{\delta}$ Pop.%	AA%	Aa%	aa%
Pflanzenhöhe	97**	108 cm	100	100	106	108
	98***	88 cm	100	99	107	105
	99***	89 cm	97	96	104	104
Ährenlänge	98**	8cm	96	95	99	104
	99*		100	100	103	104
Karyopsen Ähre	97***	23 Kary.	88	85	100	103
	98***		89	87	96	103
	99**		87	86	97	101
Kornertrag Pflanze	97***	2,33 g	78	77	93	98
	98 n.s.	1,95 g	83	82	84	85
	99 n.s.	2,13 g	79	86	92	87

Ergebnisse und Diskussion

Nach der Durchführung der Linearen Regressionrechnung konnte bei einem Signifikanzniveau von $\mu < 0,001$ die in *Tabelle 2* dargestellte Anzahl von QTLs detektiert werden.

In der Apex-Rückkreuzungspopulation konnten im Versuchsjahr 1997 fünf, im Versuchsjahr 1999 ein positiv wirkender QTL der Wildgerste detektiert werden. Die Anzahl der in der Harry-Rückkreuzungspopulation gefundenen positiv wirkenden QTLs lag im Versuchsjahr 1999 bei sechs, im Versuchsjahr 1998 bei 11. Es ist ersichtlich, dass in der Harry-Population deutlich mehr QTLs lokalisiert worden sind, obwohl nur die Hälfte polymorpher Marker zu Verfügung standen. Die größere Anzahl lokalisierter QTLs wird auf den grösseren Stichprobenumfang der Harry-Population und damit auf die höhere Pflanzenanzahl in den einzelnen Genotypklassen zurückgeführt. In der rechten Spalte sind die positiv wirkenden QTLs der Wildgerste in Bezug auf die aufgeführten Merkmale dargestellt.

In *Tabelle 3* sind vier ausgewählte Mikrosatelliten (MGB 47, 52, 46 und 173) dargestellt, im Hinblick auf die Effekte, die bei den beiden homozygoten Genotypklassen (AA und aa) auf die Merkmale Pflanzenhöhe, Ährenlänge, Karyopsen pro Ähre und Kornertrag pro

Tabelle 5: Darstellung der Merkmalsausprägungen bei MGB 173 in der Harry-Rückkreuzungspopulation

Signifikanzschwellen: n.s. = nicht signifikant, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ und *** = $P < 0,001$; $\bar{\delta}$ Harry = phänotypisches Mittel der Sorte Harry; A = Kulturelterallel, a = Wildelateral; $\bar{\delta}$ Pop% = $\bar{\delta}$ Pop.*100/ $\bar{\delta}$ Harry, AA% = AA*100/ $\bar{\delta}$ Harry, Aa% = Aa*100/ $\bar{\delta}$ Harry, aa% = aa*100/ $\bar{\delta}$ Harry; $\bar{\delta}$ Pop., AA, Aa, aa = phänotypisches Mittel der Rückkreuzungspopulation bzw. der Genotypklassen

Merkmal	Jahr	$\bar{\delta}$ Harry	$\bar{\delta}$ Pop.%	AA%	Aa%	aa%
Pflanzenhöhe	97***	108cm	100	104	95	87
	98***	88cm	100	102	97	91
	99***	89cm	97	100	91	83
Ährenlänge	98***	8cm	96	99	91	81
	99***		100	102	96	95
Karyopsen Ähre	97***	23 Kary.	88	93	82	67
	98***		89	95	78	65
	99***		87	92	80	67
Kornertrag Pflanze	97**	2,33 g	78	84	72	66
	98***	1,95 g	83	93	78	85
	99*	2,13 g	79	81	77	74

Pflanze gemessen wurden. Wie dargestellt besteht bei den Markern MGB 47 und MGB 52 in der homozygoten Genotypklasse des Kulturelterers eine senkende Wirkung in Bezug auf die aufgeführten Merkmale. Eine erhöhende Wirkung auf die vier angesprochenen Merkmale ist beim homozygoten Wildelateral festzustellen. Eine entgegengesetzte Wirkung zeigt sich bei den Markern MGB 46 und MGB 173. Durch die Komplexität und auch die Vielfalt der beeinflussten Merkmale ist zu vermuten, dass durch die vier angesprochenen Marker, Loci beschrieben werden, welche einen Einfluss auf den Phytohormonhaushalt der Pflanze haben und so eine Vielzahl von Merkmalen beeinflussen können.

In den folgenden zwei Tabellen soll kurz auf die tatsächlichen Merkmalsausprägungen der einzelnen Marker für alle drei Genotypklassen eingegangen werden.

In *Tabelle 4* sind die Merkmalsausprägungen des Kulturelterers Harry dargestellt und dazu in Relation gesetzt, zum einen der Durchschnitt der Rückkreuzungspopulation und zum anderen die drei Genotypklassen, welche durch den Marker MGB 47 beschrieben werden.

Wie ersichtlich wirkt das homozygote Wildelateral erhöhend auf die aufgeführten Merkmale. Bei den Merkmalen Pflanzenhöhe, Ährenlänge und Karyopsen pro Ähre ist eine Steigerung sowohl über den Durchschnitt der Population, als auch über die Merkmalsausprägung, welche der Kulturelter Harry zeigt, zu

drei Versuchsjahre berechnet. In den Klammern ist die Bezugsgröße (meist Kulturelter Harry) angegeben. Die Erniedrigung des Merkmals Pflanzenhöhe mittels des Markers MGB 173 lokalisiert auf 2 H, um 13 % unterhalb des Wertes der Sorte Harry ist mit einem Fragezeichen versehen, da bisher noch eine positive Korrelation mit den Merkmalen Ährenlänge, Karyopsen pro Ähre und Kornertrag pro Pflanze bestehen. Mit dem Marker MGB 47 lokalisiert auf 4 H kann sowohl die Ährenlänge um 4 %, als auch die Anzahl der Karyopsen pro Ähre um 3,5 % erhöht werden. Der Kornertrag pro Pflanze kann mit dem beschriebenen Locus noch nicht über den Kulturelter erhöht werden, jedoch zeigt sich eine 8 %-ige Erhöhung über das Populationsmittel. Bei Marker MGB 121 lokalisiert auf 5 H konnte in der Harry-Rückkreuzungspopulation tendenziell eine Erhöhung des TKGs um 3,6 % gemessen werden.

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass es möglich ist, das Leistungsniveau der verwendeten Hochleistungselter über die Einkreuzung von Wildformallelen zu steigern. Hierzu hat sich die Methode der AB-QTL-Analyse bewährt. Die so detektierten Loci der Wildform ISR 101-23 sind vermutlich auch für die Einkreuzung in andere Hochleistungselter interessant, da die Untersuchungen an zwei unabhängigen Kreuzungspopulationen

durchgeführt wurden und somit ein starker Einfluss des genetischen Hintergrundes der verwendeten Hochleistungselter auf die Merkmalsausprägung ausgeschlossen werden kann.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollen nun NILs erstellt werden, welche die hier aufgeführten Loci der Wildform enthalten. Zur Detektion weiterer Loci soll die Genotypisierung der beiden Rückkreuzungspopulationen weiter ausgedehnt werden.

Literaturverzeichnis

- BECKER, J. and HEUN M. (1995): Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Mol. Biology* 27: 835-845
- FISCHBECK, G., SCHWARZENBACH, E., SOEBECK, F. und I. WAHL (1976): Types of protection against powdery mildew in Germany and Israel selected from *Hordeum spontaneum*. *Barley genetics III. Proc. 3rd. Int. Barley genet. Symp.*. Verlag Karl Thieme, München, Seite 412-417
- BERNACCHI, D., BECK-BUNN, T., ESHED, Y., LOPEZ, J., PETIARD, V., UHLIG, J., ZAMIR, D. and S. TANKSLEY (1998): Advanced backcross QTL analysis in tomato. I. Identification of QTLs for traits of agronomic importance from *Lycopersicon hirsutum*. *Theor. Appl. Genet.* 97: 381-397
- FULTON, T.M., NELSON, J.C. and S.D. TANKSLEY (1997): Introgression and DNA marker analysis of *Lycopersicon peruvianum*, a wild relative of the cultivated tomato, into *Lycopersicon esculentum*, followed through three successive backcross generations. *Theor. Appl. Genet.* 95: 895-902
- GANAL, M. (1998): QTL-Analyse und 'advanced backcrossing' zur Verbesserung von Qualität und Ertrag unter Verwendung von unadaptiertem Genbankmaterial. *Vort. Pflanzenzüchtg.* 41: 95-109
- LIU, Z.W., BIYASHEV, R.M. and M.A. MAROOF SAGHAI (1996): Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 93: 869-876
- NELSON, J.C. (1997): QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding. *Mol. Breeding* 3: 239-245
- RUSSEL, J., FULLER, J., YOUNG, G., THOMAS, B., TARAMINO, G., MACAULAY, M., WAUGH, R. and W. POWELL (1997): Discrimination between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome* 40: 442-450
- STRUSS, D. and J. PLIESKE (1998): The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor. and Appl. Genet.* 97: 308-315
- TANKSLEY S.D., GRANDILLO, S., FULTON, T.M., ZAMIR, D., ESHED, Y., PETIARD, V., LOPEZ, J. and T. BECK-BUNN (1996): Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theor. Appl. Genet.* 92: 213-224
- WEISSENBACH, J., GYAPAY, G., DIB, C., VIGNAL, A., MORISSETTE, J., MILLASSEAU, P., VAYSSEIX, G. and M. LATHROP (1992): A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359: 794-801
- WILLIAMS, E.K. and M. TALBOT (1993): Alpha+ Experimental Designs for Variety Trails. CSIRO, Canberra and BioSS, Edinburgh
- XIAO, JH., GRANDILLO, S., AHN, SN., MCCOUCH, S.R., TANKSLEY, S.D., JIMING, L. and Y. LONGPING (1997): Genes from wild rice improve yield. *Nature* 384: 223-224

