

# Tagungsband

## 60. Tagung

24. - 26. November 2009

ZÜCHTUNG UND GENRESSOURCEN  
GEGEN ABIOTISCHE STRESSFAKTOREN

MARKERGESTÜTZTE SELEKTION IN DER PRAXIS

Vereinigung der Pflanzenzüchter  
und Saatgutkaufleute Österreichs

# **60. Tagung**

**24.-26. November 2009**

Züchtung und Genressourcen  
gegen abiotische Stressfaktoren

Markergestützte Selektion in der Praxis

Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt  
für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein

## **Impressum**

### **Tagungsband der 60. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs**

**24.-26. November 2009, Raumberg-Gumpenstein**

#### *Herausgeber*

Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs  
Wiener Straße 64, A-3100 St. Pölten  
Tel: (+43)02742/259-9021, Fax: (+43)02742/259-2009  
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*

O.Univ.Prof. Dr. Peter Ruckenbauer, Dr. Anton Brandstetter, Manuela Geppner  
Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs

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

Univ.Do. 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 © 2010*

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-13:978-3-902559-37-1  
ISSN: 2072-9596

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abschiedsrede anlässlich der 60. Tagung der Arbeitsgemeinschaft der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs</b> .....	VII
Peter Ruckebauer	
<b>In memoriam Ing. Franz HERBER (1933-2009)</b> .....	VIII
Peter Ruckebauer und Karl Fischer	
<b>Anforderungen eines Ackerbauern im Trockengebiet an die Pflanzenzüchtung in den nächsten fünf Jahren</b> .....	1
Hans Gerhard Gnauer	
<b>Wie sieht eine Weizensorte in 5-10 Jahren aus? Wie stellt sich die Pflanzenzüchtung auf kommende Veränderungen ein?</b> .....	5
Ebrahim Kazman und Andre Innemann	
<b>Plant genetic resources - a prerequisite for drought tolerance breeding in cereals</b> .....	11
Andreas Börner, Svetlana Landjeva, Khaled F.M. Salem and Ulrike Lohwasser	
<b>Drought stress and the response of wheat: nursery and complex stress diagnostic experiments</b> .....	15
János Pauk, László Cseuz, Csaba Lantos, Robert Mihály, Márta Szénási, Juhász E. Fehérmé, Tamas Lelley, Petra Majer, László Sass, Gábor V. Horváth, Imre Vass and Dénes Dudits	
<b>Plant developmental patterns and environmental adaptation in barley</b> .....	19
Ildikó Karsai, Béla Kőszegi, Klára Mészáros, Zoltán Bedő and Ottó Veisz	
<b>Phänotypische und genetische Analyse der Frosttoleranz genetischer Ressourcen von Weizen unter Feldbedingungen</b> .....	25
Jörg Leipner, Alex Giraud, Peter Stamp, Beat Keller und Caroline Plassé	
<b>Selektion auf Frosttoleranz von Winterackerbohnen (<i>Vicia faba</i> L.): Methodenoptimierung und Ergebnisse</b> .....	31
Franziska Roth und Wolfgang Link	
<b>Identification of boron (B) tolerance genes in barley and wheat</b> .....	39
Thorsten Schnurbusch, Julie Hayes, Margaret Pallotta, Peter Langridge, Tim Sutton	
<b>Validation eines neuen Genpoolkonzeptes für die Energiemaiszüchtung</b> .....	41
Hartwig H. Geiger, Henriette Burger und Walter Schmidt	
<b>Sortenentwicklung für den ökologischen Landbau bei Mais</b> .....	47
Susanne Kohls, Henriette Burger, Walter Schmidt und Hartwig H. Geiger	
<b>Importance of appropriate selection environments for breeding maize adapted to organic farming systems</b> . . .	49
Monika M. Messmer, Henriette Burger, Walter Schmidt and Hartwig H. Geiger	
<b>Einsatz von Markern in der Getreidezüchtung zur Nutzung genetischer Ressourcen</b> .....	53
Michael Koch, Jens Vaupel und Brigitte Ruge-Wehling	
<b>Molekulare Marker in der praktischen Weizenzüchtung bei RAGT</b> .....	57
Hilmar Cöster	
<b>Utilization of molecular markers in Czech wheat breeding programmes</b> .....	61
Pavel Horčíčka, Alena Hanišová, Karla Řehořová, Ondřej Veškra, Tereza Kašová, Tibor Sedláček, Jana Chrptová, Václav Šíp and Lenka Štočková	
<b>Application of molecular markers in breeding for leaf rust resistance in wheat</b> .....	65
Gyula Vida, Mariann Gál, Andrea Uhrin, Ottó Veisz, Zhulin Wang, Tibor Kiss, Ildikó Karsai and Zoltán Bedő	
<b>Kartierung der Braunrostresistenz in einer Kreuzungspopulation aus Capo x Isengrain</b> .....	73
Lydia Matiasch, Katharina Herzog, Ján Kraic, Valéria Šudyová, Svetlana Šliková, Franziska Löschenberger, Marion Marn, Julia Lafferty, Maria Buerstmayr, Hermann Buerstmayr	
<b>Markergestützte Selektion der optimalen DH-Linie</b> .....	77
Wolfgang Link und Heiko C. Becker	
<b>Markergestützte Selektion in der praktischen Kartoffelzüchtung - Erfahrungen und Perspektiven</b> .....	81
Andrea Schwarzfischer, Anita Behn, Jennifer Groth, Michael Reichmann, Adolf Kellermann und Ye-Su Songe	
<b>Entwicklung von Markern für die Resistenzzüchtung gegen Kraut- und Braunfäule in der Kartoffel</b> .....	87
Friederike Trognitz und Bodo Trognitz	

<b>Assoziationskartierung in Gerste - Ein genomweiter und Kandidatengen-Ansatz</b> .....	91
Inge E. Matthies, Stephan Weise und Marion S. Röder	
<b>Genetische Analyse neuer Resistenzressourcen für Anthraknose-Resistenz in der Blauen Süßlupine (<i>Lupinus angustifolius</i> L.) und die Entwicklung molekularer Marker</b> .....	97
Brigitte Ruge-Wehling, Christoph Thiele, Regine Dieterich, Fred Eickmeyer und Peter Wehling	
<b>Entwicklung molekularer Marker für Schwarzrostresistenz in Deutschem Weidelgras (<i>Lolium perenne</i> L.) und ihre Nutzung in Züchtungsprogrammen</b> .....	101
Katrin Beckmann, Fred Eickmeyer, Hans Lellbach, Franz Xaver Schubiger, Stephan Hartmann und Peter Wehling	
<b>Vereinfachung der markergestützten Selektion in der Pflanzenzüchtung durch die Datenbanken des Unternehmens IT-Breeding GmbH</b> .....	105
Lyudmyla V. Malysheva-Otto, Fabian Gerstenberg und Lars-Gernot Otto	
<b>Sommergerstenselektion unter Flugbrandbefall mit Infektions- und Trennstreifen statt Marker</b> .....	109
Karl-Josef Müller	
<b>Strategien gegen Zwergsteinbrand (<i>Tilletia controversa</i>) und Steinbrand (<i>Tilletia caries</i>) im ökologischen Getreidebau</b> .....	115
Markus Dressler, Benno Voit, P. Büttner und Berta Killermann	
<b>The <i>Fusarium</i> mycotoxin zearalenone inhibits Hsp90 ATPase activity and is inactivated in planta by glucosylation and sulfatation</b> .....	121
Juan Antonio Torres Acosta, Franz Berthiller, Gerlinde Wiesenberger, Rudolf Mitterbauer, Ulrike Werner, David Merz, Marie-Theres Hauser, Mehrdad Shams, Rudolf Krska and Gerhard Adam	
<b>Einfluss von Keimfähigkeit und Triebkraft auf den Feldaufgang und Ertrag bei Mais</b> .....	125
Benno Voit, Robert Schnellhammer, Joachim Eder, Berta Killermann	
<b>Charakterisierung der Wurzeleigenschaften von Khorasan- und Durumweizen mittels kapazitiver Feldmessung und Bildanalyse</b> .....	129
Gernot Bodner, Heinrich Grausgruber, Mollabashi Elnaz Ebrahimi und Hans-Peter Kaul	
<b>Weizenzüchtung auf Stein- und Zwergsteinbrandresistenz - markergestützt?</b> .....	133
Veronika Dumalasová und Pavel Bartoš	
<b>Molecular mapping of resistance to <i>Fusarium</i> head blight derived from three <i>Triticum</i> species</b> .....	137
Maria Buerstmayr, Karin Huber, Abdallah Alimari, Johannes Heckmann, Marc Lemmens, Barbara Steiner and Hermann Buerstmayr	
<b>Resistenzquellen gegenüber Ährenfusariosen und ihre Nutzung in der Weizenzüchtung</b> .....	139
Jana Chrpová, Václav Šíp, Lenka Štočková, Pavel Horčíčka, Ondřej Veškna, Tereza Kašová und Tibor Sedláček	
<b>Use of marker-assisted selection (MAS) for pyramiding leaf rust resistance genes (<i>Lr9</i>, <i>Lr24</i>, <i>Lr22a</i>) in wheat</b> .....	143
Odile Moullet, Dario Fossati, Fabio Mascher, Roberto Guadagnolo and Arnold Schori	
<b>Studies on the beta-glucan content of hull-less barley</b> .....	147
Heinrich Grausgruber, Ingrid Weinzetl, Viola Zahlner, Julia Schmidt, Philipp Wurbs und Susanne Siebenhandl-Ehn	
<b>Entwicklung und Validierung von diagnostischen Markern für das <i>Rrs2</i>-Resistenzgen gegen <i>Rhynchosporium secalis</i> in Gerste</b> .....	151
Anja Hanemann, Günther F. Schweizer und Marion S. Röder	
<b>Keimfähigkeit, Triebkraft, Feldaufgang und Steinbrandbefall bei Winterweizen mit unterschiedlicher Saatgutqualität, Brandsporenbelastung und Saatgutbehandlung im Öko-Landbau</b> .....	155
Johannes Hertrich, Benno Voit, Berta Killermann	
<b>Untersuchungen zur genetischen Variabilität von Parametern im Zusammenhang mit Trockenstressresistenz bei Gerste</b> .....	159
Gabriela Reichenberger, Birte Aschenbach, Günther Schweizer, Chris-Carolin Schön, Urs Schmidhalter und Markus Herz	

<b>Sorte x Umwelt-Interaktionen von Winterweizen im biologischen Landbau</b> .....	163
Isabell Hildermann, Monika Messmer, Peter Kunz, Anjana Pregitzer, Thomas Boller, Andres Wiemken und Paul Mäder	
<b>Klimastress-Toleranz in Gerste - Identifizierung assoziierter Gene durch umfassende quantitative Expressionsanalyse</b> .....	167
Kerstin Hofmann, Manuela Diethelm, Markus Herz, Andreas Albert, Jana Barbro Winkler, Dietrich Ernst, Urs Schmidhalter, Carola Wagner, Fritz Thümmeler, Diego Riano-Pachon, Sabrina Kleeßen, Marc Lohse, Birgit Kersten und Günther Schweizer	
<b>Brassica-Wildarten als neue genetische Ressource für die Rapszüchtung</b> .....	171
Tobias Jesske, Birgit Olberg, Heiko C. Becker	
<b>Selection for cold hardiness and late bolting for breeding winter beets</b> .....	173
Martin Kirchhoff, Conny Tränkner, Friedrich Kopisch-Obuch and Christian Jung	
<b>Fusarium head blight in barley: identification of the causal <i>Fusarium</i> species in Europe and testing of resistance using artificial inoculation</b> .....	177
Philipp Holzknacht, Paul Bury, Marc Lemmens and Hermann Buerstmayr	
<b>Longevity of seeds - intraspecific differences in the Gatersleben genebank collections</b> .....	179
Manuela Nagel, Mian Abdur Rehman Arif, Maria Rosenhauer and Andreas Börner	
<b>Phänotypische Charakterisierung der Anfälligkeit von Weizensorten gegenüber Schwarzrost (<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>) in Österreich</b> .....	183
Michael Oberforster, Martin Plank und Gerhard Bedlan	
<b>Evaluierung frei abblühender Karottensorten unter biologischen Anbaubedingungen</b> .....	187
Jürgen Renner, Klaus Dürrschmid und Heinrich Grausgruber	
<b>Development and evaluation of winter wheat breeding lines carrying Fusarium head blight QTLs from spring wheat</b> .....	191
Aziz Salameh, Bachar Almaghrabi and Hermann Buerstmayr	
<b>Bread wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) improvement for the production conditions of Kosovo</b> .....	193
Salih Salihu, Heinrich Grausgruber, Shukri Fetahu, Imer Rusinovci, Sonja Ivanovska and Hans-Peter Kaul	
<b>Gene expression analysis of related wheat lines with contrasting levels of head blight resistance after <i>Fusarium graminearum</i> inoculation</b> .....	197
Barbara Steiner, Apinun Limmongkon, Katharina Schiessl, Marc Lemmens, Haiyan Jia, Gary Muehlbauer, Alexandra Posekany, David Philip Kreil and Hermann Buerstmayr	
<b>Ertragsleistungen von Ölkürbis-Sorten in Praxisversuchen</b> .....	199
Viktoria Neubauer, Anton Brandstetter und Johann Vollmann	

## Vorwort

Meine sehr verehrten Damen und Herren, geschätzte Tagungsteilnehmer!

Als Obmann der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs ist es mir eine Freude, Sie bei dieser 60sten Tagung begrüßen zu dürfen.

Die Tagungsthemen beschäftigen sich insbesondere mit Fragen der Züchtung und Genressourcen gegen abiotische Stressfaktoren sowie markergestützte Selektion in der Praxis.

Hören wir zu Beginn, welche Erwartungen ein Ackerbauer aus dem Trockengebiet an uns hat, wie sich die Pflanzenzüchtung auf Stressfaktoren einstellt und Weizensorten in der näheren Zukunft aussehen könnten. Der Abtestung genetischer Ressourcen gegen Trockenheit oder Frost kommt hierbei entscheidende Bedeutung zu, wobei auch über den Einsatz von Markern in der praktischen Züchtung in verschiedener Hinsicht berichtet wird. Ich glaube, dass die Tagungsthemen aktuelle Fragen der Pflanzenzüchtung behandeln und zufriedenstellend beantworten werden.

Ich darf in diesem Zusammenhang Herrn Prof. Grausgruber und Mitarbeitern für die wissenschaftliche Leitung und Themenstellung und - was oft gar nicht so einfach ist - die Gewinnung der entsprechenden Vortragenden Danke sagen. Mit dem heurigen Jahr haben sie gleichsam das Erbe von Prof. Ruckebauer übernommen, den ich hiermit sehr herzlich begrüße.

Dass wir wieder an der Höheren Bundeslehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein unsere wissenschaftliche Tagung abhalten können,

verdanken wir der freundlichen Einladung und Aufnahme durch Herrn Direktor Dr. Sonnleitner, der uns mit seinem „Verwöhn-Team“ den Aufenthalt so angenehm wie möglich macht. Herzlichen Dank dafür.

Für die perfekte Vorbereitung und reibungslose Durchführung der Tagung sage ich Dr. Brandstetter, Frau Geppner und dem gesamten Team vielen Dank.

Meine sehr verehrten Damen und Herren. Die Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs hält heuer die 60. Tagung ab.

Lassen Sie mich diesen Zeitraum mit einigen Sätzen Revue passieren.

Nach dem zweiten Weltkrieg war in Österreich ein relativ rascher Produktionsanstieg auch im Bereich der Landwirtschaft zu verzeichnen. Bereits um 1950 erreichten die Erträge Vorkriegsniveau und stiegen ständig weiter an, sodass bald die Grenzen der Versorgung in wichtigen Sparten erreicht und zum Teil sogar überschritten wurden. Mit dieser beeindruckenden Entwicklung konnte die österreichische Pflanzenzüchtung aber nur eingeschränkt mithalten.

Mit Kriegsende ging die Pflanzenzüchtung vorwiegend in die Hände Privater über, die zum Teil selbstständig arbeiteten, zum Teil aber die Zuchtberatung und Grundlagenforschung der seinerzeitigen Bundesanstalt für Pflanzenbau und der Universität für Bodenkultur in Anspruch nahmen. Im Institut für Pflanzenzüchtung wurden zahlreiche Untersuchungen, insbesondere an physiologischen Eigenschaften bei Getreide gemacht und viele Kreuzungsexperimente durchgeführt.

Die Zuchtbetriebe selbst, die vorwiegend in den Getreidegebieten des Ostens lagen, mussten große Verluste an Zuchtmaterial und Einrichtungen hinnehmen.

Ihr Wiederaufbau vollzog sich jedoch rasch, wobei es zu einer laufenden Reduzierung der Zuchtbetriebe kam.

Im Jahre 1951 wurde noch in sechs der neun österreichischen Bundesländer auf 22 Getreidezuchtbetrieben gearbeitet. 1961 waren es nur mehr 19. Im Jahre 1967 haben sich in Österreich 14 Zuchtstationen mit der Getreidezüchtung befasst, 4 davon jedoch ausschließlich mit der Erhaltungszüchtung einer einzigen Roggensorte, in 10 Betrieben wurde an Getreideneuzüchtungen gearbeitet. Anfang der Achtzigerjahre befassten sich insgesamt 11 österreichische Züchter mit der Getreidezüchtung, wobei allerdings nur drei Zuchtbetriebe Bedeutung hatten. 61 österreichische Getreidezüchtungen standen damals 49 ausländischen Züchtungen gegenüber.

Heute sind die Saatzucht Donau - aus dem Zusammenschluss der Probstdorfer Saatzucht und der Saatzucht Linz entstanden - und die Saatzucht Edelfhof die einzigen Getreidezüchter von Bedeutung. In Österreich wird neben Getreide noch Züchtungsarbeit bei Kartoffeln, Mais und einigen anderen Kulturen, wie z.B. Ölkürbis, Ackerbohne und Gräser betrieben.

Obzwar es keine wesentlichen direkten Förderungen der Zuchtbetriebe gegeben hat und gibt, haben seinerzeit die staatlichen Anbau-Kontraktaktionen mit der Verpflichtung der Landwirte zum Saatgutbezug zu einer befriedigenden Einkommenssituation der Züchter geführt. Mit der Aufhebung des Saatgutpflichtbezuges Ende der Achtzigerjahre und dem Auslaufen der Qualitätsgetreide-Kontraktaktionen ist der Saatgutabsatz aber laufend gesunken. Bei Weizen und Gerste, den flächenmäßig bedeutendsten Kulturen, wird nur mehr auf ca. 40 % Originalsaatgut und somit auf 60 % Nachbausaatgut angewendet. Neben den phytosanitären Problemen, die mit der Verwendung von nicht kontrolliertem Nachbau entstehen, wie z.B. Steinbrandbefall, gehen mit dieser Entwicklung den Pflanzenzüchtern Einnahmen aus der Züchterlizenz, welche an den Absatz von Originalsaatgut gebunden ist, verloren. Eine reduzierte Züchterlizenz steht den Züchtern gemäß EU-Recht für Nachbausaatgut zu, doch wird dies in Österreich nicht exekutiert, was einen bedeutenden Einnahmefall bei den Züchtern darstellt.

Die österreichische Landwirtschaft ist Nutznießer der heimischen Zuchtsorten, die regional gut angepasst und mehrjährig abgetestet sind. Wenn aber der Saatgutabsatz noch weiter zurückgeht, wird den heimischen Züchtungsbetrieben die finanzielle Grundlage entzogen, wodurch es immer weniger möglich ist, auf Situationen wie den Klimawandel - Hitze und Trockenstress - züchterisch zu reagieren. Wir werden heute auch dazu einiges hören. Die nachhaltige Absicherung der heimischen Pflanzenzüchtung liegt im Gesamtinteresse des Landes und sollte nicht aus den Augen verloren werden. Die Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute hat mehrfach darauf hingewiesen und hofft noch immer auf Verständnis und Unterstützung für diesen Bereich.

Meine sehr geschätzten Tagungsteilnehmer. Aus dem vorhin Gesagten wird deutlich, dass die 60. Tagung zwar keinen Grund für Feierlichkeiten für die Vereinigung darstellt. Es zeigt sich aber auch, dass die Pflanzenzüchter all ihre Ressourcen mobilisieren, um jene Sorten hervorzubringen, die die Landwirtschaft in einem sich ändernden Umfeld aktuell benötigt.

Ich wünsche somit dieser Tagung viel Erfolg durch interessante Vorträge, eine interessierte Zuhörerschaft, gute persönliche und wirtschaftliche Kontakte

und Gespräche mit Partnern und Freunden und Ihnen Allen einen schönen und angenehmen Aufenthalt in dieser Region.

*Dr. Herbert ETZ*

Obmann



## Abschiedsrede anlässlich der 60. Tagung der Arbeitsgemeinschaft der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs

Peter Ruckenbauer<sup>1\*</sup>

Es ist mir heute eine große Freude und Auszeichnung Sie alle wieder in der vertrauten Umgebung im steirischen Ennstal - zu Füßen des mons altissimus, wie die Römer den steil aus dem Tal, fast 2000 Meter hoch aufragenden Berg Grimming genannt haben - und noch dazu im beeindruckenden Grimningsaal des Lehr- und Forschungszentrums für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein begrüßen zu dürfen. Ich besitze das besondere Privileg, die meisten von Ihnen persönlich zu kennen. Ich habe ab der 17. Tagung im Jahre 1966 - mit Ausnahme meines Aufenthaltes im Plant Breeding Institute in Cambridge von 1970 bis 1971 - an allen Tagungen teilgenommen. Zuerst als Zuhörer, später als mehrmaliger Vortragender bis mir der Nestor und spiritus rector dieser besonderen Tagung, Prof. Hermann Hänsel ab der 42. Tagung 1991 die Leitung übertrug. Hänsel hat 25 Jahre lang von 1965 bis 1990 mit seiner Persönlichkeit und wissenschaftlichen Integrität das Niveau dieser - damals für die Pflanzenzüchter und Züchtungsforscher aus Ost- und West Mitteleuropa unentbehrliche Begegnung wissenschaftlicher und gesellschaftliche Art - geprägt. Heute stehe ich noch einmal - fast schon als „Gumpenstein-Fossil“ vor ihnen, um nach 19 Tagungen Verantwortlichkeit die Leitung der zukünftigen Tagungen in jüngere Hände zu legen.

Dies zu tun fällt mir leicht, da ich sie meinen begabten und wissenschaftlich anerkannten drei Habilitanden, den Professoren Heinrich Grausgruber, Johann Vollmann und Hermann Bürstmayr übertragen darf. Herr Grausgruber hat bereits die vergangene 59. und vor allen diese 60. Tagung hauptverantwortlich vorbereitet. Dafür möchte ich vor ihnen meinen besonderen Dank aussprechen. Für die langjährige Betreuung möchte ich auch sehr herzlich unserem Geschäftsführer, Herrn Dr. Anton Brandstetter und seinem Team danken, das unauffällig, jedoch höchst effizient, die alljährlichen Tagungsabläufe mit allen ihren Ecken und Kanten souverän organisiert.

Gestatten Sie mir noch einige persönliche Bemerkungen über unsere, offensichtlich für viele von Ihnen und für mich, so wertvoll gewordene Veranstaltung:

Ich habe damals bei der Übernahme 1991 dieser jährlichen Begegnung zwischen pflanzenzüchterisch tätigen Forschern,

Züchtern, Saatgutkaufleuten und Behördenvertretern versprochen, bei der Auswahl der Themen die universitäre Brille öfter durch praxisnahe Augengläser zu ersetzen. Mein enge Bindung zu den verschiedensten Pflanzenzuchtbetrieben in Österreich, Deutschland, Ungarn und Kroatien hat mir dieses Vorhaben sehr erleichtert.

Im Rückblick auf diese 18-jährige Periode konnten Kontinuität und Wandel in den gewählten Vortragsthemen dank Ihrer Teilnahme und Mitwirkung immer wieder erfolgreich aufeinander abgestimmt werden. Diese Interaktion zwischen Genotyp und Umwelt - um im züchterischen Sprachbereich zu bleiben - benötigt auch zusätzlicher und spezifischer Umstände damit diese Tagungen auch langfristig gelingen. Sie reichen meiner Erfahrung nach von der oftmals strahlende Kulisse des Grimnings, der unfreiwilligen Klausur in die sie sich begeben haben, der ungebremsten kritischen Meinungsäußerung zwischen Behördenvertretern, Züchtern und Saatgutkaufleuten, der aufmerksamen Betreuung der Hausherrn und des Geschäftsführers, bis zur Solidaritätsgewissheit beim Heben von Weingläsern nach mitternächtlicher Stunde.

Aber alles in allen waren es immer Sie, die Teilnehmer, die Vortragenden, Diskutanten und Diskussionsleiter die unsere Tagungen bisher getragen haben. Ihnen verdanken wir ihr Niveau, ihre Kontinuität und ihren Wandel.

Die zunehmende Zahl der englischsprachigen Vorträge, die völlige Neugestaltung und Abstimmung der Tagungsbände auf internationale Publikations Usancen, die Aufnahme in die ISBN und ISNN Kataloge bis hin zur geplanten online Suchmöglichkeit aller bisherigen Publikationen seit 1949 waren und sind die zusätzlichen Beiträge zum Gelingen der Gumpenstein-Tagungen in dieser Periode, für die ich verantwortlich war.

Möge es der kleinen Schar der österreichischen Pflanzenzüchter weiterhin gelingen, substantielle und wertvolle Beiträge zur Weiterentwicklung der mitteleuropäischen Pflanzenzüchtung zu vollbringen. Das wäre mein Wunsch und meine Bitte an alle, die diese Tagung weiterführen werden!

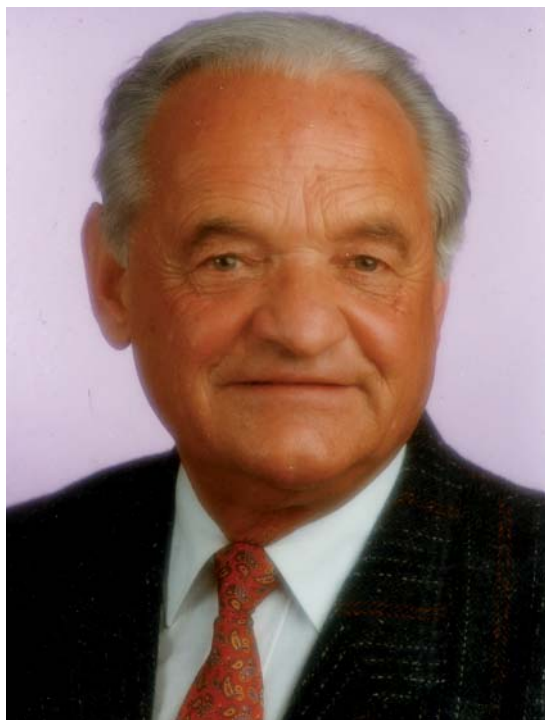
*Ad multos annos!*

<sup>1</sup> 8511 GREISDORF

\* Ansprechpartner: Univ.-Prof. Dr. Peter RUCKENBAUER, peter.ruckenbauer@boku.ac.at

## In memoriam Ing. Franz HERBER (1933-2009)

Peter Ruckebauer<sup>1\*</sup> und Karl Fischer



Unsere Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs hat in diesem Jahr wieder einen sehr erfolgreichen Züchter und lieben Kollegen verloren.

Ing. Franz HERBER wurde am 29. März 1933 in Ried im Traunkreis (Oberösterreich) geboren. Nach den Grundschulen besuchte er von 1949 bis 1951 die zweijährige Landes-Ackerbau- und Obstbauschule Ritzelhof und begann 1952 zuerst als Saatzuchtgehilfe in der Kartoffelzuchtstation der Saatbau Linz in Kefermarkt im Mühlviertel seine berufliche Laufbahn.

Mit einem bewundernswerten Arbeitswillen und einer selten anzutreffenden Begeisterung für seine Aufgabe schuf er, als völliger Autodidakt und ab 1960 als verantwortlicher Züchtleiter eine Züchterstätte, aus der in der Folge Kartoffelsorten mit hervorragenden Speisequalitäten und hoher wirtschaftlicher Bedeutung hervorgingen. Ihre Namen sind bis zum heutigen Tag den österreichischen Kartoffelanbauern in Erinnerung geblieben: Linzer Rose (1969), Linzer Gelbe

(1974), Linzer Delikatess (1975). Von den insgesamt 24 von ihm gezüchteten Sorten sind gegenwärtig noch immer die zuletzt genannte frühe Speisekartoffel Linzer Delikatess, die mittelfrühe Sorte Julia (1986) und die Speise- und Verarbeitungssorte Goldsegen (1990) im Anbau und geben Zeugnis seiner hervorragenden Züchterleistung.

Seine züchterischen Leistungen wurden durch die Verleihung des Berufstitel „Ingenieur“ durch den Bundesminister für Land- und Forstwirtschaft (1969), die Erich von Tschermak-Seysenegg Medaille der Universität für Bodenkultur (1978) und dem Hans-Kudlich-Preis der Österreichischen Gesellschaft für Land und Forstwirtschaftspolitik in Wien (1981) entsprechend gewürdigt.

Die Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs wird dem verdienstvollen Kartoffelzüchter und warmherzigen Kollegen Ing. Franz Herber auch als Vortragenden und langjährigen Teilnehmer an ihren Tagungen in besonders dankbarer Erinnerung behalten.

<sup>1</sup> 8511 GREISDORF

\* Ansprechpartner: Univ.-Prof. Dr. Peter RUCKENBAUER, peter.ruckebauer@boku.ac.at

# Anforderungen eines Ackerbauern im Trockengebiet an die Pflanzenzüchtung in den nächsten fünf Jahren

## Requirements of a farmer in the dry region of Austria to plant breeders during the next five years

Hans Gerhard Gnauer<sup>1\*</sup>

### Abstract

The increasing appearance of weather extremes has serious effects on yield and quality of field crops. This leads to a decreasing income for farmers. Therefore, main objectives in breeding programmes should be better stress tolerances, yield stability, water and nutrient efficiency as well as tolerance against the most important pathogens. Not highest yields, but stable yields at high level at all weather conditions are required by farmers. Efficiency in nutrient and water uptake by a good root system is of major importance. The better the root system, the easier long dry periods can be sustained without damage. Concerning resistance against pathogens no absolute resistance is necessary, but some susceptibility can be tolerated. The currently available durum varieties are characterized by high yield levels and good quality, however, they are very susceptible in regard to Fusarium head blight. Major improvements in Fusarium resistance would be needed as soon as possible. In the dry regions of eastern Austria wheat with high baking quality is traditionally produced. A certain minimum quality is important for marketing and for the income of the farmers. Premium wheat varieties which maintain the required quality, i.e. protein content higher than 15% and Hagberg falling numbers higher than 250 sec, also after long raining periods before harvest are of main interest for Austrian agriculture.

### Keywords

Adaptation, global warming, nutrient efficiency, quality, root system, yield, water efficiency, weather, wheat

### Einleitung

Mein Betrieb liegt an der Ostseite des Manhartsberges an der Grenze zwischen Wald- und Weinviertel im Bezirk Hollabrunn. Die Böden sind zumeist aus Löss entstandene Tschernoseme, die in der Lage sind Wasser und Nährstoffe gut zu speichern. In geringem Umfang gibt es auch stark sandige, steinige Böden und auch schwere Tonböden. Der Standort ist vom pannonischen Klima beeinflusst, teilweise sind aber auch kontinentale Klimateinflüsse aus dem nahen Waldviertel zu beobachten. Die Jahresmitteltemperatur

beträgt 9,7°C und die durchschnittliche Jahresniederschlagsmenge ist 504 mm (Daten der letzten 30 Jahre für Hollabrunn laut hydrographischem Dienst des Landes Niederösterreich).

Der Schwerpunkt des Betriebes liegt in der Produktion von Qualitätsgetreide (Premiumweizen und Durum), Stärkekartoffeln und Winterraps. Premiumweizen und Durum werden direkt an einen Verarbeiter verkauft, Stärkekartoffeln für die Fa. Agrana im Vertragsanbau produziert und Winterraps geht an einen Händler vor Ort. Auf den schlechteren Flächen des Betriebes wird Winterroggen angebaut. Zudem werden Zuckerrüben, Körnermais und Mohn kultiviert. Der Betrieb wird seit 1992 pfluglos bewirtschaftet. Dabei wird besonderes Augenmerk auf Bodenschonung und gute Fruchtfolgen gelegt. Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang die Aussaat von Begrünungspflanzen nach der Hauptkultur. Diese bleiben bis zur Frühjahrssaat auf den Feldern stehen. Die Aussaat der Sommerkulturen erfolgt dann in Mulch- bzw. Direktsaat unter vorheriger Anwendung eines Totalherbizids.

### Klimatische Veränderungen

In den letzten Jahren nehmen Wetterextreme zu, wie zum Beispiel lang anhaltende Trockenheit, Hitzewellen, starke Gewitter mit Hagel bzw. Starkregenereignisse mit bis zu 100 mm Niederschlag binnen weniger Tage. Oftmals tritt eine Frühjahrstrockenheit auf. Die Folgen sind schlecht bestockte Bestände und somit Ertragsverluste. Hitzewellen während der Hauptwachstumsphase von Raps bzw. der Blüte vermindern die Vitalität der Pflanzen bzw. die Befruchtung, was ebenfalls Ertragsverluste mit sich bringt. In letzter Zeit nehmen Starkregenereignisse unmittelbar vor bzw. zum Zeitpunkt der Getreideernte zu. Das Resultat sind geringfügig geringere Erträge wegen eines verringerten Hektolitergewichtes und, viel entscheidender für den Erlös, eine verminderte Qualität des Getreides. Durch solche Starkregenereignisse kann somit aus Premiumweizen auf Grund zu geringer Fallzahl Futterweizen werden. Gleiches gilt für Durum, wobei hier noch eine erhöhte Gefahr durch Ährenfusariose dazukommt. Speziell bei Weizen und Durum braucht die Landwirtschaft im österreichischen Trockengebiet daher Sorten die jeglicher Witterung zum Trotz stabil hohe Erträge bei nahezu gleichbleibender Qualität liefern.

<sup>1</sup> Landwirtschaftsbetrieb, Grübern 19, A-3712 MAISSAU

\* Ansprechpartner: Hans Gerhard GNAUER, [hansgnauer@aon.at](mailto:hansgnauer@aon.at)

## Kulturarten

### *Winterraps*

Größere Strohückstände vor Raps werden vor dem Stoppelsturz noch einmal nachgemulcht um die Strohverteilung und die Strohhöhe zu verbessern. Bei der Sortenwahl wird auf einen raschen Feldaufgang und eine zügige Jugendentwicklung besonderen Wert gelegt. Die Sorte Exagone eignet sich dafür bestens. Sie kann bei entsprechend früher Saat große Wurzelmassen bilden, was beim Wachstumsstart nach dem Winter und für die Winterhärte von großem Nutzen ist. Heuer wurden auch in kleinerem Umfang Visby und Pulsar angebaut um Vergleiche ziehen zu können. Probleme bei der Kulturführung bereiten in manchen Jahren Erdflöhe und Erdräupen, die größere Flächen vernichten können, sowie der Rapsglanzkäfer vor und während der Blüte. Gelegentlich kann auch die Kohlschotenmücke zum Problem werden. Aber auch Trockenheit bei der Saat ohne nachfolgende Niederschläge ist in den letzten Jahren vermehrt aufgetreten. Dies führte zu verzögertem und ungleichmäßigem Feldaufgang.

Neue Sorten sollten unter trockenen Bedingungen rasch auflaufen. Hierbei muss auch über die Beizung nachgedacht werden, da diese doch die Keimung verzögert. Besonders wichtig ist die Ausbildung einer sehr großen Wurzelmasse. Nur so bleiben die Pflanzen während auftretender Stressphasen vital und können mehr Wasser und Nährstoffe erschließen. Auch die Winterhärte und der Vegetationsstart nach dem Winter werden dadurch verbessert. Bei neuen Sorten sollte auch auf eine gute Druschfähigkeit Wert gelegt werden und auch, was in den letzten Jahren schon teils gut gelöst wurde, auf die Schotenfestigkeit. Speziell bei heftigen Gewittern zur Ernte sollen die Schoten nicht platzen. Wichtig wäre auch eine möglichst gleichmäßige Blüte und damit Abreife um sogenannte „Gummischoten“ zu vermindern.

### *Winterweizen und Winterdurum*

Aufgrund seiner guten Qualitäts- und Ertragsleistungen wird bei mir die Sorte Astaro angebaut. Mit dieser Sorte ist es möglich Premiumweizen ( $\geq 15\%$  Protein,  $\geq 280$  s Fallzahl) mit etwas weniger Stickstoffeinsatz als üblich zu produzieren bei gleichzeitig hohen Erträgen. Einziges Manko dieser Sorte ist die leichte Auswuchsneigung bei Schlechtwetter vor der Ernte und die damit verminderte Fallzahl. Bei Winterdurum passt die Sorte Auradur nach den Erfahrungen aus der Vergangenheit sehr gut in unser Gebiet und liefert gute Erträge. Probleme bereitet bei Weizen und Durum oftmals eine trockene Witterung während der Bestockungsphase und auch Schossphase. Dabei werden die Ertragsanlagen geschädigt und Ertragsverluste sind die Folge. Häufiger werden die Probleme von Niederschlägen während der Blüte und damit Fusariumprobleme sowie Niederschläge vor der Ernte, welche die Qualität (v.a. die Fallzahl) massiv beeinträchtigen und damit zu Mindererlösen führen. Abgeleitet vom durchschnittlichen Börsepreis für Premiumweizen 2009 gegenüber Futterweizen kann dadurch eine Mindererlös von 275 € ha<sup>-1</sup> bei 5.500

kg ha<sup>-1</sup> Ertrag entstehen. Das sind für einen Betrieb mit 50 ha Weizen 13750 € weniger Erlös!

Neue Sorten müssen in dieser Hinsicht unbedingt bessere Eigenschaften aufweisen, sie müssen qualitativ den Wetterextremen standhalten. Auch denke ich, dass N-Düngemittel wieder teurer werden als derzeit. Einen Vorgeschmack darauf hatten wir von 2008 auf 2009 zu erleben. Wir mussten mit teurem Dünger arbeiten und hatten dann noch zur Ernte 2009 schlechte Preise. Hier wären Sorten wünschenswert, die mit weniger Dünger auf gleiche Erträge und Qualitäten kommen, sprich die Nährstoffe besser ausnutzen können, d.h. Sorten, die ein größeres Wurzelsystem ausbilden, was auch in Trockenphasen von Vorteil wäre. Weiters gilt es Sorten zu züchten die hinsichtlich der Standfestigkeit keine Probleme haben und auch schweren Stürmen standhalten. Bei Winterdurum muss weiter intensiv an verbesserter Winterhärte und Fusariumresistenz gearbeitet werden.

### *Winterroggen*

Heuer wurde erstmals die Sorte Guttino angebaut, zuvor Evolo. Seit Jahren wird die Ertragskraft von Hybridsorten auch auf schlechten Standorten genutzt und ich bin sehr zufrieden mit den erzielten Erträgen. Die Probleme sind die gleichen wie bei Weizen. Roggen ist in punkto Auswuchs noch anfälliger als Weizen und daher in den letzten Jahren vor allem im benachbarten Waldviertel oft nur als Futterroggen vermarktet gewesen. Auch hier liegt ein beträchtlicher Preisunterschied zwischen Mahl- und Futterware.

Die Anforderungen an neue Sorten sind ähnlich wie bei Weizen. Hinsichtlich pilzlicher Krankheiten hat sich mit den neuen Hybriden zwar schon viel verbessert, dennoch bedarf es bei den Resistenzen noch weiterer Steigerungen, sodass man im Trockengebiet auf eine Abreifebehandlung verzichten kann.

### *Sommerdurum*

Hier setze ich auf die Sorte Floradur, weil sie seit Jahren die ertragreichste Sorte ist. Mit ihr waren schon Erträge über 6500 kg ha<sup>-1</sup> möglich (bei drei N-Gaben). Dies jedoch nur, wenn die Witterung beim Auflaufen und zur Bestockung passte, d.h. entsprechender Niederschlag vorhanden war. Neben den auch bei Weizen üblichen Problemen sind bei Durum in letzter Zeit verstärkt Fusariumprobleme zu beobachten. Neue Sorten müssen unbedingt in Richtung Fusariumresistenz gezüchtet werden. Auch die Bestockungsfähigkeit gehört stark verbessert.

### *Körnermais*

Mais ist bei den Wetterextremen die toleranteste Kultur. Es wird sehr viel in guten Witterungsphasen wieder ausgeglichen. Ich setze hier derzeit auf die Sorten DKC 3511 (FAO 340) und DKC 4490 (FAO 400). Im Hinblick auf die Verbesserung der Erlöse der Landwirte wäre eine schnellere Abtrocknung des Korns am Stamm wünschenswert. In manchen sehr warmen Jahren konnte Mais schon mit Feuchtigkeiten <20% geerntet werden. In diese Richtung gehört speziell bei den spätreifen, ertragreichen Sorten etwas

getan. Die Standfestigkeit der Sorten sollte im Hinblick auf Maiszünslerbefall verbessert werden. Derzeit gibt es Sorten die brechen bei Zünslerbefall zusammen, während andere stehen bleiben. Wünschenswert wären auch Toleranzen gegenüber neue Schädlinge wie dem Maiswurzelbohrer. Auch die Strohmenge kann bei neuen Körnermaissorten weiter reduziert werden.

### *Stärkekartoffel*

Bei Stärkekartoffel wurden bisher sehr gute Erfahrungen mit den Sorten Merkur (NÖS) und Eurostarch (Europlant) gemacht. Beide Sorten liefern sehr hohe Erträge mit hohen Stärkegehalten. Die Sorte Roberta liefert zwar auch sehr hohe Stärkegehalte, jedoch ist bei ihr die Gefahr von Rhizoctonia gegeben. Probleme bereitet eine trockene Witterung während des Knollenansatzes und längere Trockenphasen über den Sommer sowie Starkregenereignisse hinsichtlich Krankheitsausbreitung wegen der schlechten Befahrbarkeit der Felder.

Unter trockenen Bedingungen wäre eine Verbesserung des Knollenansatzes wünschenswert bzw. auch, dass Knollen Trockenphasen gut überstehen und danach bei Regen keine neuen Knollen ansetzen (charakteristisch für die Sorte Kuras). Die Resistenzen gegen Krankheiten müssen weiter

verbessert werden vor allem im Hinblick auf Starkregenereignisse und die damit verbundene unmögliche Befahrbarkeit der Felder. Zu achten ist auch auf eine gute Rodbarkeit der Sorten. Es bringt nichts, wenn die Sorten den höchsten Ertrag bringt, aber schwer zu roden ist. Durch die erhöhten Rodekosten schwindet der Ertragsvorteil. Hinsichtlich der Transportkosten zum Werk sollte der Stärkegehalt verbessert werden um weniger Wasser zu transportieren. Im Trockengebiet sind Sorten mit schnellem Auflaufverhalten und guter Bodenabdeckung wünschenswert um den Verlust von Wasser so gering wie möglich zu halten. Was im Sortenspektrum nach wie vor fehlt, in Ansätzen in letzter Zeit aber schon vorhanden ist, sind frühe Sorten mit einem guten Ertrag und guten Stärkegehalten, um die Stärkewerke schon früher beliefern zu können.

### **Schlussfolgerungen**

Das vermehrte Auftreten von Wetterextremen hat gravierende Auswirkungen auf den Ertrag und vor allem die Qualität der Feldfrüchte. Das führt zu Mindererlösen der Landwirte. Dazu müssen neue Sorten mit einer erhöhten Stresstoleranz, Ertragstabilität, Wasser- und Nährstoffeffizienz sowie Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten gezüchtet werden. Wichtige Qualitätsparameter müssen bei jedem Wetter erreicht werden können.

# Wie sieht eine Weizensorte in 5-10 Jahren aus? Wie stellt sich die Pflanzenzüchtung auf kommende Veränderungen ein? How will a wheat variety look in 5 to 10 years? How will wheat breeding cope with future challenges?

Ebrahim Kazman<sup>1\*</sup> und Andre Innemann<sup>1</sup>

## Abstract

Wheat is a major food crop world-wide. In order to cope with the future increase in global population, increasing urbanization, changes in food habits and increasing demand due to increased consumption, wheat production must be drastically increased. Climatic changes and changes in cultivation practices due to tight rotations and limitation in the application of chemicals create additional challenges for the global wheat production. Since cultivation area and resources are limited only an increase in yield per unit area appears to be a practical solution. Wheat breeding has led to major progress in increasing yield world-wide and will remain a major driver in increasing yield per unit area. Developing a new wheat variety is a long-lasting and costly process which takes more than 10-13 years and requires an investment of at least 2-3 million Euros per variety. Certified seed exchange is the only way to finance such a 'micro-evolution', i.e. the development of a new high performing variety. The decreasing use of certified seed in Europe and the absence of a well-functioning seed and intellectual property law system in most of the member states are major threats to future investment in breeding which is necessary to handle the challenge from continuing changes and increasing world demands.

## Keywords

Bread making quality, climate change, protein, royalty, seed exchange, *Triticum aestivum*, variety development

## Einleitung

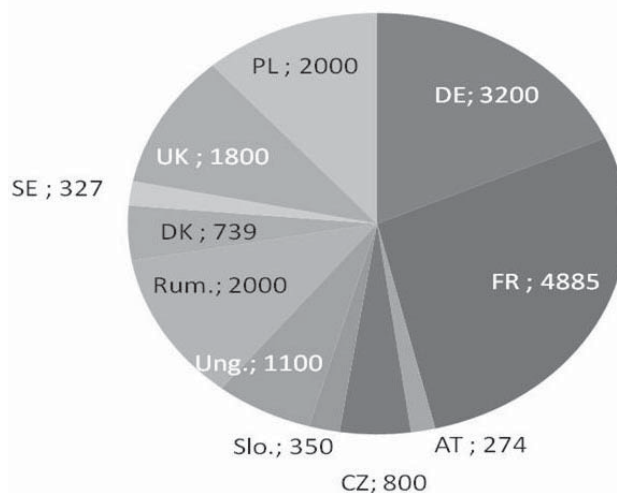
Weltweit ist Weizen eine der bedeutendsten Kulturarten für die menschliche Ernährung. Die Bedeutung des Winterweizenanbaus in Europa wird in *Abbildung 1* verdeutlicht. Die flächenmäßig führenden Länder sind Frankreich, Deutschland, Polen, Großbritannien sowie Rumänien. In Deutschland liegt der Anteil von Winterweizen an der Getreideanbaufläche bei ca. 50%. Um die Weizenversorgung auch in Zukunft zu sichern, müssen die Auswirkungen globaler Entwicklungsprozesse rechtzeitig erkannt und ganz besonders von der Züchtung berücksichtigt werden. Diese

zu erwartenden Veränderungen kann man in drei Faktoren zusammenfassen.

## Globale klimatische Veränderungen

Nach derzeitigem Erkenntnisstand werden sich die klimatischen Veränderungen vor allem in zunehmender Häufigkeit extremer Witterungssituationen zeigen. Für die Landwirtschaft und damit auch für die Züchtung sind dabei entscheidend:

- Zunahme der mittleren Jahrestemperatur (mildere Winter, wärmere Sommer: Verfrühung bzw. Verlängerung der Vegetationsperiode)
- Zunahme von Witterungsextremen (starke Temperaturstürze und Kahlfröste, Hitze, Starkniederschläge)
- Veränderungen der jährlichen Niederschlagsverteilung (Trockenheit in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, verlängerte Trocken- bzw. Feuchtperioden)
- Veränderung des Auftretens von Weizenkrankheiten.



*Abbildung 1: Winterweizen Anbaufläche Europa 2009 (in 1000 ha; Quelle: AMI, Coceral)*

*Figure 1: Winter wheat acreage in Europe 2009 (in 1000 ha; source: AMI, Coceral) (AT, Austria; CZ, Czech Republic; DE, Germany; DK, Denmark; FR, France; PL, Poland; Rum, Romania; SE, Sweden; Slo, Slovakia; UK, United Kingdom; Ung, Hungary)*

<sup>1</sup> Lantmännen SW Seed Hadmersleben GmbH, Kroppenstedter Straße 4, D-39398 HADMERSLEBEN

\* Ansprechpartner: Dr. Ebrahim KAZMAN, ebrahim.kazman@swseed.com

Künftig werden Weizensorten gefordert, die auch unter verschiedenen Stresssituationen hohe und stabile Erträge realisieren. Zur Selektion der gewünschten unterschiedlichen Sortentypen wird das Winterweizen-Zuchtmaterial der Züchtungsunternehmen europaweit unter optimalen Stressbedingungen selektiert und geprüft. Daraus resultieren nach einem mehrstufigen Prüfungsverfahren Sortenkandidaten für unterschiedliche Anbaugebiete, z.B. für Hohertragsregionen oder für Gebiete mit geringerem Ertragsniveau. Bevorzugt werden solche Stämme weitergeführt, die sich unter unterschiedlichsten Prüfungsbedingungen als relativ ertragsstabil erweisen. Zur Sicherung stabiler Erträge bei längerer Vorsommertrockenheit wird die Züchtung von frühreifen Sorten intensiviert. Dabei werden auch verstärkt begrenzte Weizen einbezogen.

### Markt- und Nachfrageentwicklungen

Neben den sich ändernden natürlichen Anbaubedingungen führen die sich vollziehenden gesellschaftlichen Entwicklungen zu teilweise neuen Marktanforderungen an die Züchtung und die Erzeugung des Weizens. Folgende Faktoren sind dabei zu erwähnen:

- Zunahme der Weltbevölkerung bedingt wachsenden Weizenbedarf für die menschliche Ernährung
- wachsender Wohlstand führt zu höherem Verbrauch (z.B. Fleischverzehr)
- Veränderung der Verzehrgeohnheiten
- vermehrter Anbau von „Energiepflanzen“.

Nach UNO-Schätzungen (World Population Prospects, <http://esa.un.org/unpp/>) wird sich die Weltbevölkerung von gegenwärtig ca. 6,7 Mrd. auf ca. 9,2 Mrd. Menschen im Jahr 2050 erhöhen. Die höchsten Zuwachsraten werden für Afrika (+1 Mrd. was einer Verdopplung der gegenwärtigen Bevölkerung entspricht) und Asien (+1,2 Mrd.) erwartet. Dieses Bevölkerungswachstum in Kombination mit zunehmendem Wohlstand, insbesondere in China und Indien (derzeit 33% der Weltbevölkerung) führt global zu einem steigenden Weizenbedarf. Es ist deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit zu erwarten, dass zur Deckung des wachsenden Nahrungsmittelbedarfs der Weltweizenhandel deutlich zunehmen wird. Damit ergeben sich künftig auch für Deutschland gute Möglichkeiten weiter steigende Weizenmengen zu vermarkten. Es sind in der Zukunft auch Umstellungen der Verzehrgeohnheiten der Erdbevölkerung denkbar, die neue Anforderungen an die Weizenqualität stellen werden. Der zunehmende Bedarf an speziellen Broten, wie Fladenbrot/Flachbrot oder Nachfrage nach weißkörnigem Vollkornbrot sind als Beispiele zu nennen. Ein helles Vollkornbrot aus weißkörnigem (hard-white) Weizen weist gegenüber dem dunkleren Vollkornbrot Vorteile auf. Es enthält z.B. weniger Bitterstoffe und erfordert deshalb keinen Fett- oder Zuckerzusatz. Unter der Berücksichtigung des global stark steigenden Nahrungsbedarfs ist die Nutzung von Weizen als Rohstoff für die Energiegewinnung kritisch zu betrachten.

### Veränderungen im Pflanzenbau

Im Bereich des Pflanzenbaus sind angesichts von Klima- und Marktveränderungen, zahlreiche Umstellungen zu erwarten.

Dazu zählen die frühe Aussaat, nicht-wendende Bodenbearbeitung, enger werdende Fruchtfolgen sowie zunehmende Mais-Weizen-Fruchtfolgen. Solche Umstände werden mit Sicherheit zu verstärkten biotischen sowie abiotischen Stress führen. Weitere Anpassungen werden durch EU-weite Anwendungsbeschränkungen von Agrochemikalien notwendig werden. Daraus ergeben sich zusätzliche Herausforderungen für die Züchtung.

### Ertragssteigerung und Ertragsicherheit

Da die Weizenanbaufläche nur sehr begrenzt ausgedehnt werden kann, ist eine wachsende Weizenerzeugung fast ausschließlich durch steigende Flächenerträge zu realisieren. Wir gehen davon aus, dass sich die langfristig nachgewiesene Entwicklung der Weizenerträge (*Abbildung 2*) auch künftig fortsetzen wird. Berücksichtigt man, dass in den letzten Jahren der Anteil der Sorten mit A-Qualität stetig angewachsen ist, die ein dem B-Weizen vergleichbares Ertragsniveau erreicht haben, fällt der jährliche Zuchtfortschritt noch höher aus. Gegenwärtig ist noch nicht mit Sicherheit abzusehen, ob die langjährigen intensiven Züchtungsaktivitäten zum großflächigen Anbau von Hybridsorten führen werden. Bisher erreichten die zugelassenen Hybridsorten europaweit gegenüber den konventionell gezüchteten Weizensorten nicht die erforderlichen Mehrerträge und werden deshalb nur in einem begrenzten Umfang angebaut. Den konventionell züchtenden Unternehmen gelang es immer wieder, das Ertragspotential des Weizens zu steigern. Unter Hohertragsbedingungen wurden zur Ernte 2009 in Schleswig-Holstein beispielsweise schon  $14 \text{ t ha}^{-1}$  in amtlichen Sortenprüfungen erreicht. Ein Ende der Ertragssteigerungen ist gegenwärtig noch nicht abzusehen. Die Leistungsfähigkeit der moderneren Sorten zeigt, dass sich der Züchtungsfortschritt nicht nur im Kornertrag dokumentiert, sondern auch in der Resistenz, den agronomischen Eigenschaften und seit den 1970er Jahren auch in den Backeigenschaften. Für einen weiteren züchterischen Fortschritt im Ertrag sind die Intensität der Resistenzzüchtung sowie die Kombinationsmöglichkeiten von Ertrag und Qualität unter Berücksichtigung des Rohproteingehaltes von großer Bedeutung.

### Wie viele Resistenzen sind nötig?

Durch die schon erwähnten Klimaveränderungen wird der Druck von bestimmten feuchtigkeitsliebenden Krankheiten (z.B. Septoria) abnehmen. Dafür werden verschiedene Rostkrankheiten (einschließlich Schwarzrost) mit höheren Temperatur- bzw. geringeren Feuchtigkeitsansprüchen sowie Viruskrankheiten, die durch mildere Winter begünstigt werden, zunehmen. Darauf haben sich die Weizenzüchter bereits jetzt eingestellt. Bezüglich der toxinbildenden Fusariosen werden die züchterischen Aktivitäten nach wie vor mit großer Intensität weiter geführt. Ziel ist es eine stabile allgemeine Toleranz gegenüber den wichtigsten Krankheitserregern zu erreichen. Bezüglich der weiteren Ertragssteigerung muss festgestellt werden, dass mit Ausnahme der Fusariosen alle anderen wichtigen Krankheiten mit dem Ertrag nicht negativ aber auch nicht eindeutig positiv korrelieren (*Tabelle 1*). So können bei ausreichender Krankheitstoleranz (geringer bis mittlerer Krankheitsdruck) mit minimaler Fungizidapplikation möglichst hohe De-

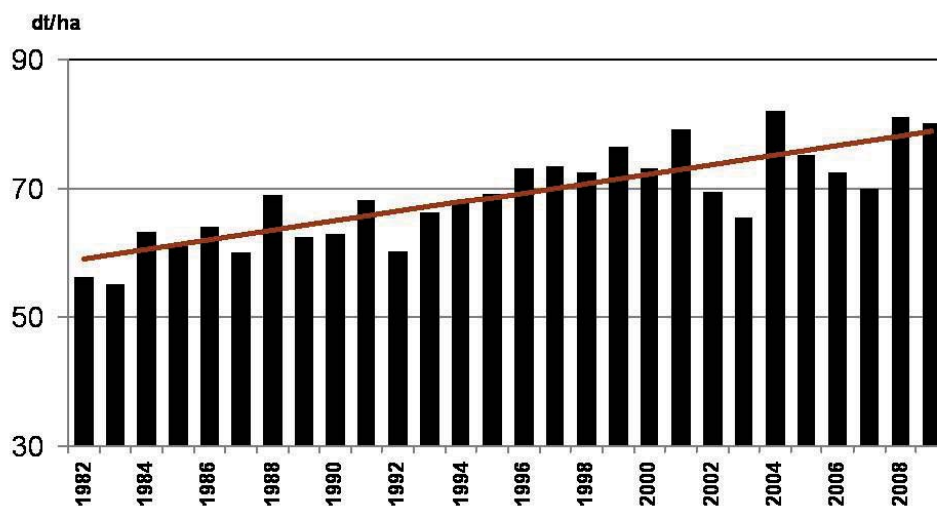


Abbildung 2: Erträge von Winterweichweizen in Deutschland 1982-2009 (Quelle: BSL 2008, 2009 = Schätzung) (2002: sehr feucht mit Auswinterung; 2003: durchgehend trocken; 2006: trocken in Kornfüllungsphase; 2007: trocken in Jugendentwicklungsphase)

Figure 2: Winter wheat yield in Germany, 1982-2009 (Source: German Variety List, 2008, 2009 = Forecast) (2002: very moist with winter damage; 2003: continuous drought; 2006: drought during grain filling; 2007: drought during early crop development)

Tabella 1: Korrelation zwischen Anfälligkeit und Ertrag in den 340 WP1-Stämmen (2005-2007)

Table 1: Correlation between susceptibility for lodging, powdery mildew, Septoria, DTR wheat blight, yellow rust, leaf rust and Fusarium head blight and yield in 340 lines of the first official trial in Germany (2005-2007)

Merkmale	Ertrag St1	Ertrag St2
Lager	0,09	-0,23
Mehltau	-0,01	-0,11
Septoria	-0,07	0,03
DTR	-0,39	0,05
Gelbrost	-0,28	-0,06
Braunrost	-0,08	-0,07
Fusarium BBA	0,45	0,17

ckungsbeiträge der Landwirtschaftsbetriebe gesichert werden. Absolut-Resistenzen sind z.T. Nichtertragsmerkmale, die eventuell den Zuchtfortschritt im Ertrag verlangsamen und den Zuchtvorgang verteuern können.

## Kombinationsmöglichkeiten von Ertrag und Qualität

Für die weitere Erhöhung des Ertragspotenzials von Brotweizen erweisen sich die gegenwärtig festgelegten Mindestnormen des Proteingehaltes für die verschiedenen Qualitätsgruppen des Weizens als hemmend. In *Tabella 2* sind die Korrelationen zwischen Qualitätsparametern (Protein, Sedimentationswert und Backvolumen) mit dem Kornertrag von 459 WP1-Stämmen der Jahre 1999-2008 dargestellt. Wie zu entnehmen ist, weist der Proteingehalt eine engere negative Beziehung mit dem Ertrag auf als der Sedimentationswert oder das Backvolumen. Die geringere Korrelation zwischen Backvolumen und Ertrag deutet darauf hin, dass ein höherer Proteingehalt nicht unbedingt höhere Backvolumina erzeugt. Umfangreiche Untersuchungen haben bislang gezeigt, dass Proteingehalt und Backvolumen

Tabella 2: Beziehung zwischen Ertrag und Qualitätsmerkmalen der WP-Stämme in zwei Jahren (2003 = trocken und 2004 = optimal)

Table 2: Correlation between quality traits (protein content, sedimentation value, baking volume from Rapid Mix Test) and yield in lines of the official trials in Germany (2003 = dry, 2004 = normal)

Merkmalskorrelationen	Korrelationskoeffizient
Protein 03 - Ertrag 03	-0,63
Protein 04 - Ertrag 04	-0,91
Protein 03+04 - Ertrag 03+04	-0,83
Sedi 03 - Ertrag 03	-0,41
Sedi 04 - Ertrag 04	-0,38
Sedi 03 + 04-Ertrag 03+04	-0,52
RMT 03 - Ertrag 03	-0,49
RMT 04 - Ertrag 04	-0,51
RMT 03+04 - Ertrag 03+04	-0,75

sortenspezifisch in Beziehung stehen (*Abbildung 3*). Es sind durchaus Sorten vorhanden, die mit relativ geringem Proteingehalt ein vergleichbar höheres Backvolumen erbringen. Bei solchen Sorten ist eine qualitätsbetonte N-Spättdüngung sehr wahrscheinlich weder ökonomisch noch ökologisch sinnvoll. Es gibt in Deutschland bei der Qualitäts-Klassifizierung des Weizens mehrere Beispiele dafür, dass spezielle Sorten wegen geringerer Proteingehalte nicht in die ihrer Backqualität entsprechenden Qualitätsgruppe zugeordnet werden. Mit der Änderung der zurzeit existierenden Gewichtung des Proteingehaltes wird einerseits die Züchtung auf ertragreichen Qualitätsweizen erleichtert, andererseits wird unnötige N-Düngung vermieden.

## Wie wird eine Weizensorte in 5-10 Jahren aussehen?

Eine Weizenpflanze im klassischen Trockengebiet ist gewöhnlich lang und begrannt um unter den gegebenen Be-



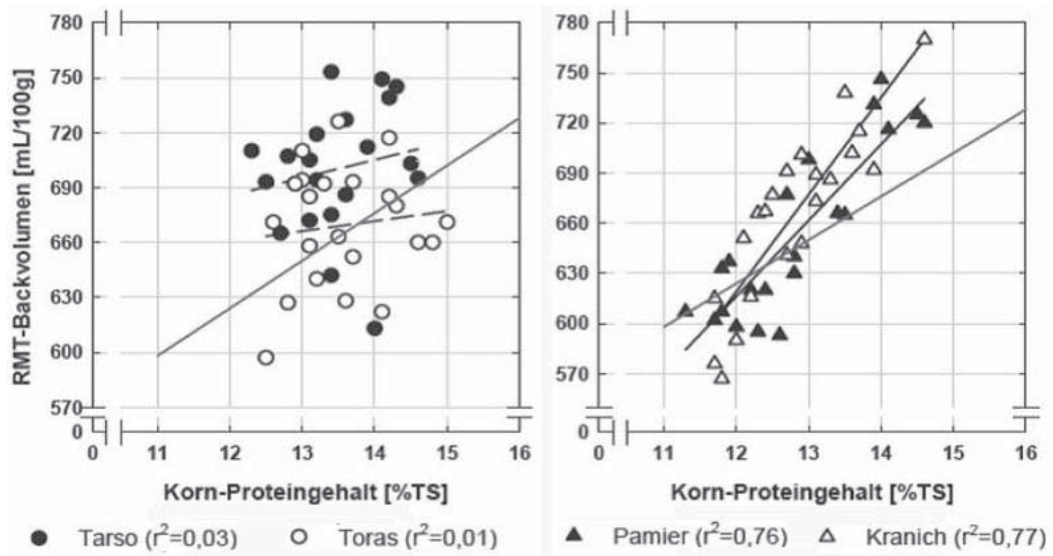


Abbildung 3: Beziehung zwischen Kornproteingehalt und Backvolumen in zwei unterschiedlichen Sortentypen (Quelle: Frau S. SELING, MRI, Detmold)

Figure 3: Relationship between protein content and Rapid Mix Test loaf volume in two differently reacting group of winter wheat varieties (Source: S. SELING, MRI, Detmold)

dingungen Ertrag bilden zu können. Spelzen-Behaarung ist ein weiteres Merkmal, das wahrscheinlich zu Stresstoleranz (Kälte und Trockenheit) führt. Diese Eigenschaften sind jedoch in klassischen Feuchtgebieten von Nachteil. Hier sind die Weizenpflanzen eher kurz, unbegrannt und standfest. Da wir es aber in der Zukunft weder mit klassischen Feucht- noch mit Trockenregionen zu tun haben werden, kann man die folgenden Eigenschaften für die zukünftigen Weizensorten hervorheben:

- Frühreife
- Standfestigkeit
- Stresstoleranz, Wasser-Effizienz, Umlagerungseffizienz
- Anpassung an aktuelle Verfahrensentwicklungen im Pflanzenbau und Restriktionen in der Agrarchemie-Anwendung
- Ertrag und gute Qualität (mit geringeren Eiweißgehalten?).

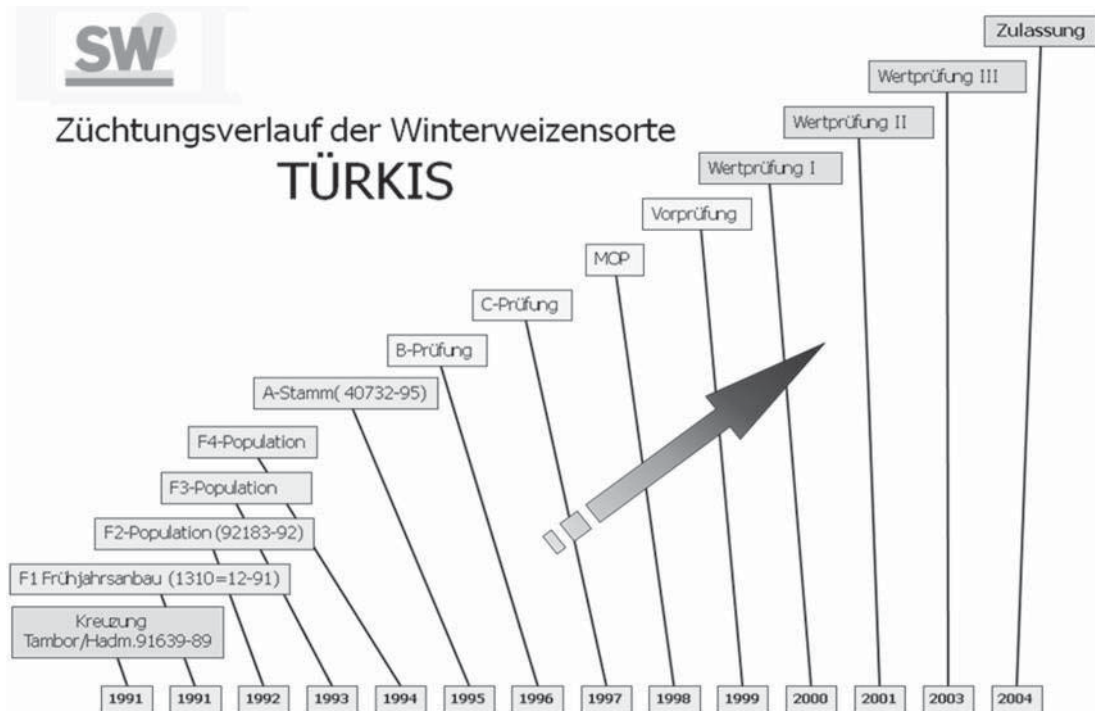


Abbildung 4: Züchtungsverlauf der Winterweizensorte Türkis

Figure 4: Development of winter wheat variety Türkis

**Tabelle 3: Winterweizen-Anbaufläche, Saatgutbedarf und Saatgutwechsel in einigen europäischen Ländern (Quelle: AMI, Coceral, eigene Berechnung)**

**Table 3: Winter wheat in major European countries: acreage, seed demand, seed exchange, farm-saved seed (Source: AMI, Coceral, own estimation)**

	DE	FR	AT	CZ	SK	HU	RO	DK	SE	UK	PL
Anbaufläche (1000 ha)	3200	4885	274	800	350	1100	2000	739	327	1800	2300
Saatgutbedarf (1000 t)	560	855	47	152	67	220	400	109	60	311	478
Saatgutwechsel (%)	44	55	40	60	20	12	15	80	70	58	10
Nachbaugebühren (%)	50	-	-	-	-	-	-	50	60	50	
Anzahl Züchter	13	13									

Das Ziel der Zukunft wird sein: immer mehr Nahrungsmittel und gleichzeitig mehr nachwachsende Rohstoffe zu erzeugen und dies mit Umwelt und Ressourcen schonenden Techniken. Um diesen zukünftigen Anforderungen gerecht werden zu können, sind intensivere züchterische Arbeiten notwendig. Hierzu gehören vor allem moderne Züchtungstechniken, wie z.B. die Nutzung von Markern und Laboruntersuchungen. Um die Fixierung gewünschter Merkmale zu beschleunigen, wird zunehmend die Doppelhaploiden/Einkorn-Ramsch-Methode eingesetzt, die zur schnelleren Entwicklung neuer erfolgreicher Sorten führt. Ziel der Weizenzüchtung ist und bleibt - vorausschauend - ertragreiche Sorten mit guten Qualitäten und brauchbaren Resistenzen der Landwirtschaft zur Verfügung zu stellen.

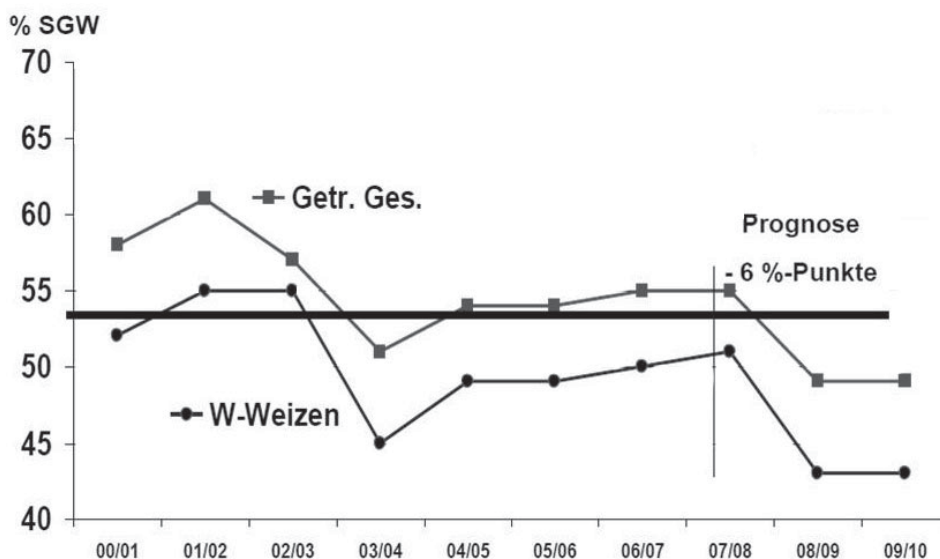
der Züchtungsverlauf einer Winterweizensorte beispielhaft dargestellt. Die Entwicklung neuer Weizensorten von der Kreuzung der Elternlinien bis hin zum kommerziellen Anbau dauert mindestens 11-13 Jahre. Sie wird mit ca. 2-3 Mio. Euro pro Sorte vom jeweiligen Zuchtunternehmen vorfinanziert. In mehreren Schritten werden die Zuchtlinien vielen Resistenz-, Ertrags und Qualitätsprüfungen unterzogen, bis sie zur offiziellen Prüfung angemeldet werden können. Nach den offiziellen 3-jährigen Wertprüfungen beim Bundessortenamt, wird eine dann zugelassene Sorte einer 2-3jährigen Prüfung in Landessortenversuchen unterzogen, bis die Vermarktung der Sorte nennenswerte Lizenzeinnahmen erzielt.

### Entwicklung einer Sorte - Die Mikro-Evolution

Eine Weizensorte stellt das Ergebnis einer „Mikro-Evolution“ dar. Im Laufe des Zuchtprozesses haben die neuen Zuchtlinien alle auftretenden Klimaextreme durchlaufen und nur Stämme welche dies erfolgreich bestehen, haben eine Chance am weiteren Selektionsverfahren teilzunehmen und als fertiges Produkt „Sorte“ dem Landwirt zur Verfügung gestellt zu werden. Die Züchtung einer neuen Getreidesorte ist mit hohem zeitlichem und finanziellem Aufwand verbunden. In *Abbildung 4* wird anhand der Sorte Türkis

### Wirtschaftlichkeit der Weizenzüchtung

Die Züchtung finanziert sich allein durch Lizenzeinnahmen, die beim Verkauf von zertifiziertem Saatgut fällig werden sowie durch Nachbaugebühren. Die Saatgutvermehrung von Winterweizen umfasste in Deutschland zur Ernte 2009 ein Areal von 53000 ha. Diese Vermehrungsfläche teilen sich ca. 13 verschiedene Zuchtunternehmen. Zu den führenden Zuchtunternehmen gehört Lantmännen SW Seed mit einem Flächenanteil von 12,7%. Betrachtet man die entsprechend dem Anbau von Weizen zu erzielenden Einnahmen (Lizenzen) in Europa, wären in Deutschland bei 100% Saatgutwechsel ca. 40 Mio. € für die Züchtung ver-



**Abbildung 5: Z-Saatgutwechsel (SGW) bei Getreide und Winterweizen 2000-2009 in Deutschland (Quelle: R. MÜLLER, BDP)**  
**Figure 5: Development in certified seed exchange rate in Germany from 2000-2009 (Source: R. MÜLLER, BDP)**

füßbar. Beim derzeitigen Saatgutwechsel von 44% (*Tabelle 3*) verbleiben davon 17,6 Mio. € den Züchtern.

Die Züchtung will auch weiterhin ihren Beitrag dazu leisten, den Landwirten sowie allen an der Wertschöpfungskette Beteiligten Sorten zur Verfügung zu stellen, die allen zukünftigen Erwartungen entsprechen. Dafür ist aber ein Finanzierungssystem notwendig, das die Entwicklung einer neuen Sorte langfristig sichert, d.h. dass hier eine „Geben-und-Nehmen-Situation“ zu Stande kommt. Die Praxis indes sieht im Moment anders aus: Die Agrarzeitung vom 2. Oktober 2009 spricht von einem „dramatisch niedrigem

Saatgutwechsel“. Der negative Trend beim Einsatz von zertifiziertem Saatgut (Z-Saatgut) bei Getreide im Allgemeinen, sowie Winterweizen im Speziellen, wird in *Abbildung 5* verdeutlicht. Dieser negative Trend muss beendet werden, da mit den Lizenzeinnahmen aus Z-Saatgut und den Nachbaugebühren der Züchter der Zuchtfortschritt in 10 Jahren vorfinanziert wird. Mit weiterhin abnehmenden Einnahmen der Züchter (bei gleichzeitigen Kostensteigerungen), steht die Zukunft der Pflanzenzüchtung auf einem dünner werdenden Fundament. Diese Entwicklung wird sicherlich tiefgreifende Strukturänderungen in der Züchterlandschaft und der Saatgutwirtschaft mit sich bringen.

## Plant genetic resources - a prerequisite for drought tolerance breeding in cereals

Andreas Börner<sup>1\*</sup>, Svetlana Landjeva<sup>2</sup>, Khaled F.M. Salem<sup>3</sup> and Ulrike Lohwasser<sup>1</sup>

### Abstract

One of the largest *ex situ* genebanks of the world is located at the Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research in Gatersleben. This collection comprises wild and primitive forms, landraces as well as old and more recent cultivars of cultivated plants including cereals. Wheat is the major crop having almost 30,000 accessions. Beside the long term storage and frequent regeneration of the material phenotypic characterisation and evaluation data are collected as a prerequisite for gene identification and mapping. In our presentation we give examples for the successful utilisation of germplasm for the identification of genes (quantitative trait loci) determining drought tolerance in wheat. The material was investigated at the seedlings and adult plant (grain filling) stages.

### Keywords

Drought tolerance, germplasm, osmotic stress, QTL mapping, *Triticum*, wheat

### *Ex situ* genebank collections

Plant *ex situ* genebank collections comprise seed genebanks, field genebanks and *in vitro* collections. Species whose seed can be dried, without damage, down to low moisture contents, can be stored in seed banks. Field genebanks and *in vitro* storage are used primarily for species which are either vegetatively propagated or which have recalcitrant seeds that cannot be dried and stored for long periods. It is estimated that worldwide approximately 90% of the genebank holdings are stored as seeds whereas around 10% and 1% are maintained *in vivo* in the field and *in vitro*, respectively (FAO 1998, BÖRNER 2006).

Globally germplasm collections contain more than 6 million accessions of plant genetic resources. Wheat represents the biggest group with about 800,000 accessions followed by barley (490,000 accessions) and rice (420,000 accessions). The 10 largest world-wide germplasm collections by crop are given in Table 1 (FAO 1998).

The German *ex situ* genebank, located at the Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) in Gatersleben, Germany, is one of the largest global collections. About 150,000 accessions are maintained including cereals (65,000), legumes (28,000), vegetables (18,000),

Table 1: List of the ten largest world-wide germplasm collections by crop (FAO 1998)

Crop	Genus	Accessions
Wheat	<i>Triticum</i>	788,654
Barley	<i>Hordeum</i>	486,724
Rice	<i>Oryza</i>	420,341
Maize	<i>Zea</i>	261,584
Bean	<i>Phaseolus</i>	268,369
Oat	<i>Avena</i>	223,287
Soybean	<i>Glycine</i>	176,400
Mustard	<i>Brassica</i>	106,923
Sorghum	<i>Sorghum</i>	168,550
Apple	<i>Malus</i>	97,543

forage crops (14,000), oil crops (8,000), potatoes (6,000) and medicinal and spice plants (6,000). Within the cereals wheat (*Triticum*) and barley (*Hordeum*) represent the largest groups having 28,000 and 22,000 accessions, respectively (Figure 1, ANONYMUS 2008). The Gatersleben genebank holdings consist of plant materials collected as early as the 1920's. Initial collection missions were made to the Austrian Alps (1922-1932), Anatolia (1928-1932), the Hindukush (1935), the Himalayas (1937-38), Tibet (1938-39), Ethiopia and Eritrea (1937-1939) and the Balkans (1941-1942) (BÖRNER 2006).

Beside the collection and maintenance of the germplasm in genebanks one of the main challenges nowadays is the evaluation and successful utilisation of these resources.

Number of accessions

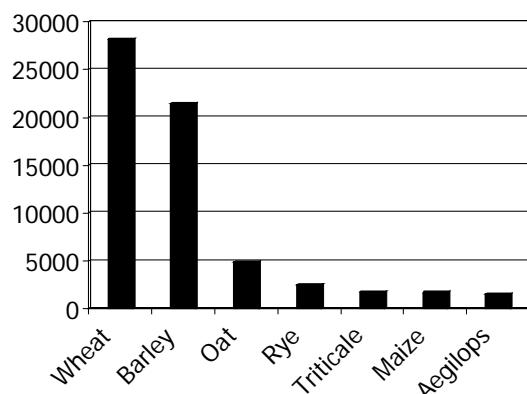


Figure 1: Inventory of the cereals collection maintained in the German *ex situ* genebank (ANONYMUS 2008)

<sup>1</sup> Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Corrensstraße 3, D-06466 GATERSLEBEN

<sup>2</sup> Institute of Genetics, Bulgarian Academy of Sciences, 1113 SOFIA, Bulgaria

<sup>3</sup> Genetic Engineering and Biotechnology Institute (G.E.B.R.I.), Menoufia University, SADAT CITY, Egypt

\* Ansprechpartner: Priv. Doz. Dr. Andreas BÖRNER, boerner@ipk-gatersleben.de

Phenotypic characterisation associated with genetic analyses will enable us to the potential of genebank accession for further improvement of modern cultivars.

### Drought tolerance at the seedlings stage

A set of 114 recombinant inbred lines (RILs) from the International Triticeae Mapping Initiative (ITMI) mapping population was used for detecting genes/quantitative trait loci (QTL) for drought (osmotic stress) tolerance at the seedlings stage. This population was derived by single seed descent F8 from the cross between W 7984 and Opatá 85. The parent W 7984 is an amphihexaploid wheat synthesized from *Triticum tauschii* (DD) × *Triticum durum* (AABB) cv. Altar 84, while Opatá 85 is a Mexican spring wheat variety developed at CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo) in Mexico.

Osmotic stress was induced by 12% PEG (PEG 6000) treatment. Distilled water was used as control. Eight seeds per line and variant were placed in lanes in covered transparent plastic boxes on two layers of filter paper moistened with PEG solution or distilled water. Seeds were germinated in a growth chamber at 21±1°C in dark for 3 days and under 12 h light:12 h dark regime in the next 5 days. Root length, coleoptile length and shoot length were measured on 5 seedlings per line. Root length/shoot length ratio was also determined. For all traits the tolerance index was calculated as a ratio between the mean trait value obtained under stress and the corresponding trait value under control. Three independent replications of the experiment were conducted.

The phenotypic data were used for QTL analysis. The presence of QTL was determined with QGene software package (NELSON 1997) using single marker analysis. In total of 35 regions on 10 chromosomes contributed effects on seedling growth traits. Five of the chromosomes are presented in *Figure 2*. The details of the study are described in LANDJEVA et al. (2008).

### Drought tolerance at the adult plant stage

The same set of 114 RILs of the ITMI population was grown on the experimental fields at IPK Gatersleben during the growing seasons 2001 and 2003. The lines were grown together with the parents in plots with four rows, 1 m long with 20 cm between rows. Anthesis was recorded when about 50% of the plants showed spikes with exerted anthers in the central third of the spikes. Fourteen days after anthesis, chemical desiccation was applied to two rows of the plot of each genotype, while the other two rows were kept untreated (without desiccation). The desiccation treatment was applied by spraying the whole plant canopy to full wetting with an aqueous solution of potassium iodide (KI, 0.5% w/v). The desiccant was applied using a hand-held boom sprayer allowing spray penetration to the whole plant canopy.

At maturity, the spikes were collected and threshed on a plot basis. After harvest, 1000-grain weight was measured for treated and non-treated rows. Based on that, the post-anthesis drought tolerance index was calculated from the performance of the stressed plants (S) relative to its respective non-stressed controls (C) within the same replicate and cal-

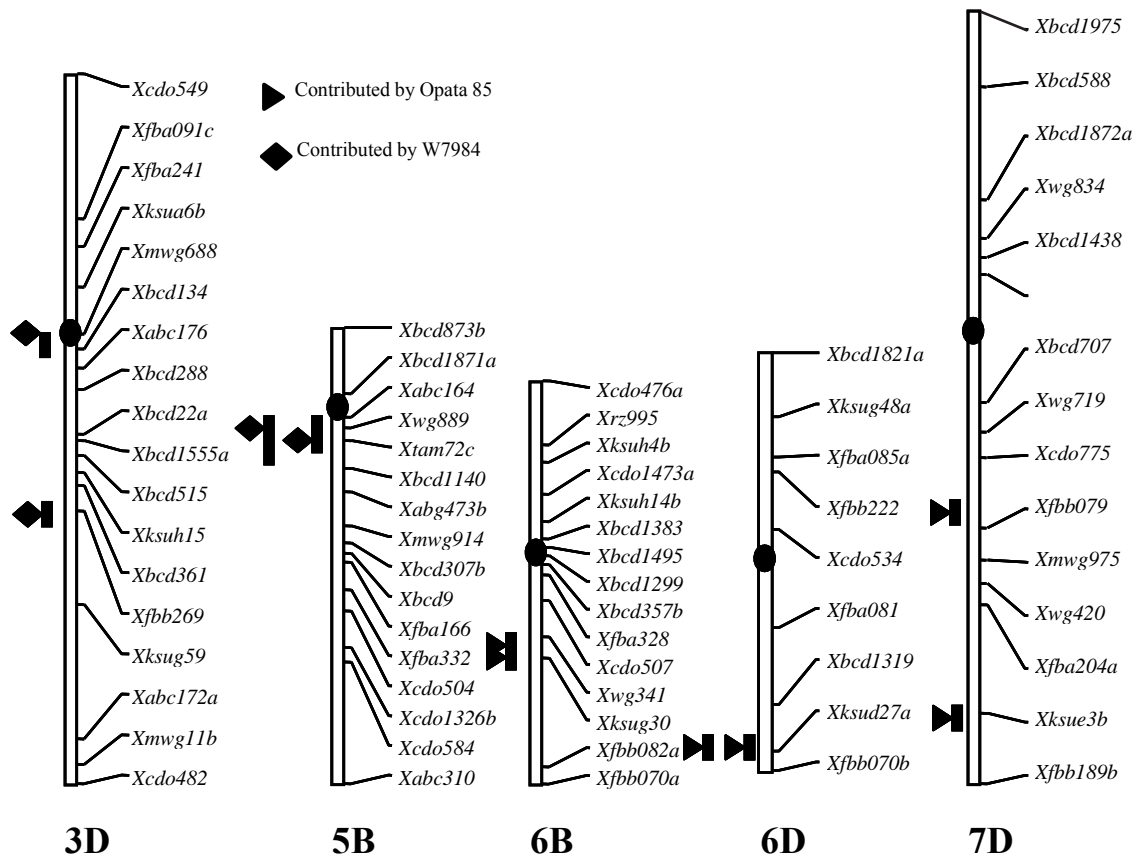


Figure 2: Selected chromosomes carrying loci determining seedling growth traits (modified after LANDJEVA et al. 2008)

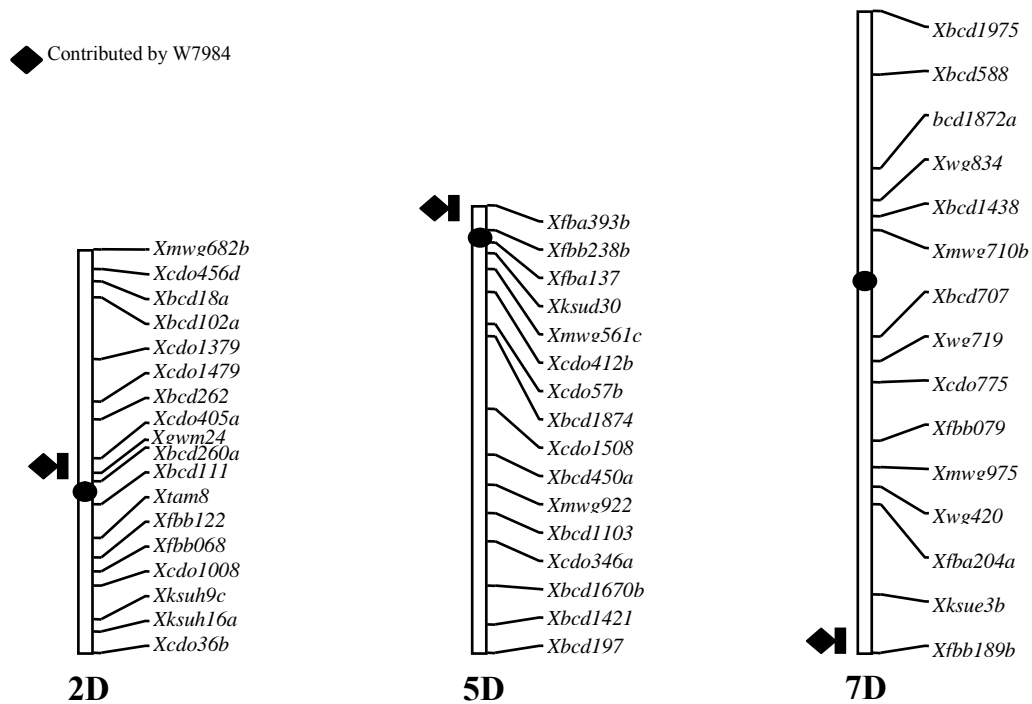


Figure 3: Chromosomes carrying loci determining post anthesis drought tolerance/stem reserve mobilisation (SALEM et al. 2007)

culated as percentage according to BLUM et al. (1983a,b). The stress tolerance index (STI) was calculated as

$$STI(\%) = \frac{S \times 100}{C}$$

where C is the 1000-grain weight under control and S the 1000-grain weight under potassium iodide (KI) treatment.

Using the QGene software package (NELSON 1997) QTL for stem reserves mobilisation (drought tolerance after anthesis), were mapped on chromosomes 2D, 5D and 7D. Results are presented in Figure 3, details are described by SALEM et al. (2007). Interestingly, the QTL on chromosome 7DL maps in a comparable position to one being responsible for osmotic stress tolerance at the seedlings stage (Figures 2 and 3). In addition, it should be mentioned that clusters of QTLs determining grain yield under drought stress were detected in homoeologous regions at distal parts of chromosomes 7AL and 7BL by QUARRIE et al. (2005).

## Conclusions

Extensive germplasm collections do exist globally in which wheat represents the largest crop. Nowadays the utilisation of the genebank holdings for crop improvement including abiotic stress tolerance is one of the main challenges. The successful exploitation of genetic resources requires (1) extensive characterisation and evaluation and (2) genetic analysis and molecular mapping of the relevant traits. Detected loci determining drought tolerance at different developmental stages can be combined and transferred to modern cultivars via marker assisted selection.

## References

- ANONYMUS, 2008: Annual Report, Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, 222 pp.
- BLUM A, MAYER J, GOLAN G, 1983a: Chemical desiccation of wheat plants as a simulator of post-anthesis stress. II. Relations to drought stress. *Field Crops Res* 6, 149-155.
- BLUM A, POYARKOVA H, GOLAN G, MAYER J, 1983b: Chemical desiccation of wheat plants as a simulator of post-anthesis stress. I. Effects on translocation and kernel growth. *Field Crops Res* 6, 51-58.
- BÖRNER A, 2006: Preservation of plant genetic resources in the biotechnology era. *Biotechnol J* 1, 1393-1404.
- FAO, 1998: The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 510 pp.
- LANDJEVA S, NEUMANN K, LOHWASSER U, BÖRNER A, 2008: Molecular mapping of genomic regions associated with wheat seedling growth under osmotic stress. *Biol Plant* 52, 259-266.
- NELSON JC, 1997: QGENE: software for mapping - based genomic analysis and breeding. *Mol Breed* 3, 239-245.
- QUARRIE SA, STEEDA, CALESTANI C, SEMIKHODSKII A, LEBRETON C, CHINOY C, STEELE N, PLJEVLJAKUSIC D, WATERMAN E, WEYEN J, SCHONDELMAIER J, HABASH DZ, FARMER P, SAKER L, CLARKSON DT, ABUGALIEVA A, YESSIMBEKOVA M, TURUSPEKOV Y, ABUGALIEVA S, TUBEROSA R, SANGUINETI MC, HOLLINGTON PA, ARAGUÉS R, ROYO A, DODIG D, 2005: A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring × SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. *Theor Appl Genet* 110, 865-880.
- SALEM KFM, RÖDER MS, BÖRNER A, 2007: Identification and mapping quantitative trait loci for stem reserve mobilisation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Res Commun* 35, 1367-1374.

## Drought stress and the response of wheat: nursery and complex stress diagnostic experiments

János Pauk<sup>1\*</sup>, László Cseuz<sup>1</sup>, Csaba Lantos<sup>1</sup>, Robert Mihály<sup>1</sup>, Márta Szénási<sup>1</sup>, Juhász E. Fehérné<sup>2</sup>,  
Tamas Lelley<sup>3</sup>, Petra Majer<sup>2</sup>, László Sass<sup>2</sup>, Gábor V. Horváth<sup>2</sup>, Imre Vass<sup>2</sup> and Dénes Dudits<sup>2</sup>

### Abstract

Breeding for drought tolerance is becoming a more and more important challenge in case of crop plants, notably in wheat in Europe, not only in the Mediterranean area, but in central Europe too. The breeding process includes the characterization of the basic breeding material in regard to performance under well-watered and drought stressed conditions. For our experiments we set up a mobile automatic rain shelter (MARS) system in the breeding nursery and a complex stress diagnostic system (CSDS) in greenhouse tests of the Cereal Research Non-Profit Limited Company, where we could analyze the responses of different wheat materials to drought stress. Wheat plants were grown under ideal water regime in parallel experiments using sprinkler irrigation and shadowing by MARS. In greenhouse the tested wheat materials were grown under optimal (watering to 60% of the 100% soil water capacity) and suboptimal stress (watering to 20%) conditions. The effect of water withholding on plant growing was registered by a digital imaging system in CSDS and traditional way under MARS. After harvesting, plant heights, spike lengths, grain numbers, total grain weights and other agronomical parameters were measured and values of well-watered and stressed plants were compared.

### Keywords

Digital image analysis, rain shelter, *Triticum aestivum*, water stress, yield loss

### Introduction

Limited water condition, i.e. drought, is one of the most important abiotic stress factors. Depending on the season drought can limit crop production seriously. Plant responses to drought stress are complex mechanisms which include molecular changes and extend to the whole plant metabolism influencing the morphology and phenology of plants (BLUM 1996, CHAVES et al. 2003, CONDON et al. 2004, MOLNÁR et al. 2004). Breeding for drought tolerance is an important challenge in case of crop plants, especially in wheat (*Triticum aestivum* L.). The breeding process includes the characterization of the basic breeding material in regard to performance under well-watered and drought stressed

conditions. In recent years many approaches to select wheat genotypes which are resistant to drought were described, e.g. improved water use efficiency (BLUM 2005, CHAERLE et al. 2005, HU et al. 2006), drought resistance indices (MARDEH et al. 2006) or simulation of drought conditions in the greenhouse (GÁSPÁR et al. 2005, HOFFMANN and BURUCS 2005). It is clear that an extensive approach is needed to test a complex trait like drought tolerance. Therefore, in our experiments mobile automatic rain shelter (MARS) and complex stress diagnostic system (CSDS) were set up in the breeding nursery and in the greenhouse, where we could analyze the responses of different wheat germplasm to drought. In this way tolerant genotypes could be tested and selected.

### Materials and Methods

#### *Field drought tolerance tests*

For testing drought tolerance in the field, the MARS was constructed and installed in Szeged. The MARS covers an area of 720 m<sup>2</sup>. Rain sensors manage the closing mechanism which completely covers the field plots by a convertible plastic tunnel. Drain ditches prevent the side-wetting from the neighboring soil profiles. Drought can be traced by two automatic meteorological stations which continuously measure the rainfall, sun radiation, dew point, soil moisture, soil temperature, air temperature, wind direction and speed. About 100 winter wheat genotypes have been tested on two-row plots in three replications in 2007/2008. Most of the tested genotypes were advanced breeding lines of the Cereal Research Co., and check varieties. All genotypes were planted in two-row plots in 3 replications by a Seedmatic sowing machine (Wintersteiger, Ried, Austria) in October 2007. Plot size was 0.5 m<sup>2</sup>. Effects of drought were evaluated by measuring plant height, acceleration in heading time, depression of the yield components, grain yield and the difference between the canopy temperatures of stressed vs. control plots of the different genotypes. The later method has been considered to be effective in screening wheat genotypes for drought tolerance (WINTER et al. 1988, BLUM 1998, INAGAKI and NACHIT 2008, MATUZ et al. 2008) since tolerant genotypes can maintain photosynthesis (and evaporation) longer (WINTER et al. 1988) and their canopy

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Cereal Research Non-Profit Limited Company, Alsó kikötő sor 9, HU-6726 SZEGED

<sup>2</sup> Institute of Plant Biology, Biological Research Center, Temesvári krt. 62, HU-6726 SZEGED

<sup>3</sup> Universität für Bodenkultur, Wien, IFA Tulln, Konrad-Lorenz-Str. 20, A-3430 TULLN

\* Ansprechpartner: Dr. János PAUK, janos.pauk@gabonakutato.hu

temperature is lower. Canopy temperature was determined by a Crop Trak infrared thermometer (Spectrum Technologies, Plainfield, IL). Out of the MARS a sprinkler irrigated parallel experiment was sown with a similar randomization. The data from the two different experimental conditions were compared in our computing evaluation.

### Greenhouse drought tolerance tests

For greenhouse drought experiments the CSDS was established in the greenhouse of the Cereal Research Co., Szeged, where we could analyze the responses of different wheat material to indoor drought stress conditions. Five pots per genotype were exposed to drought stress conditions and five others were treated as controls. Water capacity of soil was determined and pots were watered twice a week to 20% (stressed) and 60% (well-watered) of the soil water capacity, respectively. Watering was done automatically by a plant watering system including a balance in connection with a computer-mediated peristaltic pump. As pots had a radiofrequency identifier, watering data could be stored automatically by computer. Days to heading were registered individually for each plant. The effect of water withholding on plant growing was tracked weekly by a digital imaging system on the basis of number of plant pixels (Olympus Camedia C-7070 digital camera). Plants were harvested after ripening. Plant heights (measured from ground to the last node) and spike lengths (without awns) were measured. Shoots were dried at 40°C for 4 days to permanent water content. Shoot dry weight, number of grains and total grain yield weight were measured. In this experiment (after previous practical data), the tolerant genotypes were as 'Tolerant control' (Tol. 1) and GK 11-05 and two sensitive genotypes were: 'Sensitive control' (Sens. cont.) and 'Chinese sensitive' (Ch. sens). Wheat seedlings were vernalised at 3°C for 6 weeks. Plants were transferred into pots containing a mixture of 50% Terra peat soil and 50% Maros sandy soil, two in each pot. Equal quantities of chemical fertilizer (Substral Osmocote Plus) were put in each pot at the time of planting. After a week, plants were thinned and one was left in each pot.

### Breeding for drought tolerance

Our drought tolerant breeding system is a modified pedigree method, based on manual crossing, head selection from  $F_2$  until uniform head-rows are available. Generally from  $F_4$  information yield trials, later four-replicated yield trials, and at last multi-location performance tests help to select the best advanced lines. From  $F_5$  quality tests and parallel scoring in rust (*Puccinia recondita*, *P. graminis*) and virus nurseries (under provocative conditions) give additional information for successful selection. In the younger, segregating

generations ( $F_3$ - $F_5$ ) visual scoring of morphological and phenological characters is the only effective method to evaluate drought tolerance of a large number of genotypes (10 000-20 000 accessions per year). The most important traits that may be checked visually are: leaf firing, leaf rolling, leaf colour under serious stress, hairiness or glaucosity of leaves, kernel size and healthiness. Fast seedling emergence, rapid phenological development in spring, earliness in heading, anthesis and maturity are also advantageous parameters in regard to drought tolerance (CSEUZ et al. 2009).

## Results

### MARS experiments

The effect of water withdrawal (under MARS) caused significant differences on plant height and thousand kernel mass and significantly decreased grain yield and changed heading time and canopy temperature. Among the tested genotypes plant height was 89.4 cm in the treated (shaded) and 94.5 cm in the control treatment. Water shortage decreased plant height by 5.1 cm which means a 5.4% depression. Tolerant genotypes' depression in growth was more moderate than susceptible ones' (Table 1). Water stress also affected heading time. Mean of heading time was 137.7 days after 1<sup>st</sup> January (17<sup>th</sup> May) in the control treatment while it happened on 12<sup>th</sup> May in the stress treatment. Here heading accelerated and on average of the tested genotypes heading time started earlier by 5.8 days, which means a 4.2% shorter time from the beginning of the year. Grain yield of the 85 tested genotypes decreased on average by 36.8% while thousand kernel mass (TKM) decreased by 7.8%. The two-row plots' average grain yield was 394 g in the irrigated, and 249 g in the stress treatment, which means a 36.8% depression. Only about 22% of grain yield loss could be explained by TKM depression. The rest of the yield depression could be happen due to the lesser number of fertile and productive spikes. The higher number of secondary spikes also decreased the difference of TKM between the two treatments. Midday canopy temperature measurements were executed on two hot days, the 28<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> May. Air temperature was 34°C and 30°C during the measurements. Canopy temperature was 22.7°C and 19.1°C on average of the control plots and 27.9°C and 24.2°C in the treated (stressed) treatments. Generally, the results of drought stress trials has no correlation to yield data. The best correlation with MARS data were found with grain yield ( $r = 0.628-0.836^{***}$ ).

### CSDS experiments

In case of days from planting to heading the sensitive 'J4-11' and 'Sens cont.' genotypes responded with earlier heading to

Table 1: Effects of water deficiency on the tested genotypes (average of 85 wheat genotypes)

Treatments	Plant height (cm)	Heading time (d)	TKM (g)	Grain yield (g)	Canopy temp. (28/05) (°C)	Canopy temp. (30/05) (°C)
Control	94.5	137.7	44.7	394	22.7	19.1
Stress	89.4	131.9	41.2	249	27.9	24.2
Difference	5.1	5.8	3.5	145	-5.2	-5.1
LSD5%	3.3	3.4	3.9	23.5	4.8	5.1
Control %	94.6	95.8	92.2	63.2	122.9	126.7



stress. Earlier heading is a general response of sensitive wheat plants to drought. In case of 'GK 11-05' and 'Tol. cont.' no significant differences in time of heading in the two different water treatments were observed. Growing curves of the two varieties ('GK 11-05' and 'Tol. cont.') were constructed from the data of complex stress diagnostic system and the curves were studied. GK 11-05 has not reduced growing in response to stress until the end of the growing period, while sensitive J4-11 stopped growing after heading and used its so far collected reserves to produce grain. Since wheat varieties of different origin differ in morphological and agronomical parameters it is better to compare the parameters in relative values (percentages) instead of absolute values. Agrobotanical (plant height, spike length, dry weight) and yield parameters (grain number, grain weight) of the well-watered plants were set to 100%. Concerning yield parameters of the tolerant varieties there was less depression in response to stress. The most significant differences between treatments could be observed in the number of seeds. However, in case of plant height and spike length all varieties suffered only a slight depression. There were differences in shoot dry weight, too: the 'Tolerant cont.' and GK 11-05 varieties suffered 45% and 55% depression, respectively, while the 'Sensitive cont.' and J4-11 varieties suffered 60% and 67% depression, respectively. Therefore, the polygons representing the tolerant and the sensitive genotypes differ in their areas. In CSDS the plants grown under drought conditions were significantly different in their morphological aspects and in their yield parameters from the well-watered plants. Drought had serious effects on plant growing (green and dry weights): stems were thinner and spikes were smaller than those of their ideally watered parallels. Yield depression was remarkable in case of all varieties, but depressions were more significant in sensitive genotypes.

## Discussion

In our nursery and greenhouse stress diagnostic system we could analyze the responses of different wheat genotypes by modeling drought stress. Water withholding had serious effects in case of all wheat genotypes on morphological and yield parameters. Sensitive genotypes responded with earlier heading and, therefore, shortened life cycle to stress (HOFFMANN and BURUCS 2005). Varieties referred as tolerant had no significant differences in time of heading. Hence, registering time of heading proved to be a useful tool to characterize genotypes. Tracking the growing rate of plants can serve as a useful tool in testing varieties for drought tolerance. Digital imaging is a modern and non-invasive method in evaluating green weight of plants on the basis of pixel number without cutting and measuring them (KACIRA and LING 2001). Furthermore, with this method the growing of plants can be followed week by week and a growing curve can be drawn for each plant and (a cumulated growing curve) for each genotype. Hence, the size of control and stressed plants can be compared at any period of growing. There were no significant differences between the genotypes tested in the depression in plant height and stem length, but shoot dry weight was more reduced in sensitive genotypes than in tolerant ones. Therefore, it can be

assumed that shoot dry weight measured after harvesting is also a relevant parameter in characterizing wheat genotypes for drought tolerance.

Yield parameters are the most important agronomical traits in selecting drought tolerant genotypes. Depression in grain number and total grain yield was significantly smaller in tolerant genotypes. We would like to note that in the selection of a drought tolerant genotype with high yield, one has to consider not only yield stability but high yield at good producing conditions, too (ARAUS et al. 2002). In respect to this, our results can be completed with this factor by using different stress indices (MARDEH et al. 2006). However, so far there are no reports on the use of stress indices in greenhouse experiments. Greenhouse experiments mean somehow artificial conditions to field crops. Therefore, results gained in greenhouse experiments are further evaluated by comparing them to results of field nursery tests. Besides characterizing wheat genotypes in regard to drought tolerance our stress diagnostic system can also be useful in testing other plant species, e.g. rice or barley, for different kinds of abiotic stresses, e.g. heat or frost, or for biotic stresses too. Also mapping populations can be effectively screened by our diagnostic system. The system is currently under development. We are going to broaden the range of measured parameters by installing infrared thermal imaging and fluorescent imaging systems. These modern non-invasive methods could complete our diagnostic system by giving a better physiological characterization of plants (CHAERLE and VAN DER STRAETEN 2001). The mentioned greenhouse selection method was integrated in our conventional winter wheat breeding programme. All these tests can only be additional methods in the breeding procedure besides visual scoring of morphological and phenological traits. Important information can be obtained also from multi-location yield trials, especially at drier locations and/or in drier years. Significant improvement in drought tolerance of future wheat varieties can only be achieved by the combination of all these data. The advance in drought tolerance can be found among our latest registered wheat varieties and numerous new advanced winter wheat breeding lines (candidates for registration) with a higher level of adaptability to dry environments.

## Acknowledgements

This work was sponsored by NAP\_BIO\_06-NEWSEEDS PlantResource research grant.

## References

- ARAUS JL, SLAFER GA, REYNOLDS MP, ROYO C, 2002: Plant breeding and drought in  $C_3$  cereals: What should we breed for? *Ann Bot* 89, 925-940.
- BLUM A, 1996: Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regul* 20, 135-148.
- BLUM A, 1998: Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilization. In: Braun HJ, Altay F, Kronstad WE, Beniwal SPS, McNab A (Eds.), *Wheat: Prospects for global improvement*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 135-141.
- BLUM A, 2005: Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential - are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Aust J Agr Res* 56, 1159-1168.

- CHAERLE L, VAN DER STRAETEN D, 2001: Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochim Biophys Acta* 1519, 153-166.
- CHAERLE L, SAIBO N, VAN DER STRAETEN D, 2005: Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *Trends Biotechnol* 23, 308-315.
- CHAVES MM, MAROCO JP, PEREIRA JS, 2003: Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol* 30, 239-264.
- CONDONAG, RICHARDS RA, REBETZKE GJ, FARQUHAR GD, 2004: Breeding for high water-use efficiency. *J Exp Bot* 55, 2447-2459.
- CSEUZ L, PAUK J, LANTOS C, KOVÁCS E, 2009: Wheat breeding for drought tolerance. Efforts and results. Proc VIII Alps-Adria Scientific Workshop. *Cereal Res Commun, Suppl* 37, 245-248.
- GÁSPÁR L, CZÖVEK P, FODOR F, HOFFMANN B, NYITRAI P, KIRÁLY I, SÁRVÁRI É, 2005: Greenhouse testing of new wheat cultivars compared to those with known drought tolerance. *Acta Biol Szeged* 49, 97-98.
- HOFFMANN B, BURUCS Z, 2005: Adaptation of wheat (*Triticum aestivum* L) genotypes and related species to water deficiency. *Cereal Res Commun, Suppl* 33, 681-687.
- HU YC, SHAO HB, CHU LY, GANG W, 2006: Relationship between water use efficiency (WUE) and production of different wheat genotypes at soil water deficit. *Colloid Surface B* 53, 271-277.
- INAGAKI MN, NACHIT MM, 2008: Visual monitoring of water deficit stress using infrared thermography in wheat. In: Appels R, Eastwood R, Lagudah E, Langridge P, Mackay M, McIntyre L, Sharp P (Eds.), Proc 11<sup>th</sup> Wheat Genet Symp, 24-29 Aug, Brisbane, P181, Sydney University Press, Sydney.
- KACIRA M, LING PP, 2001: Design and development of an automated and non-contact sensing system for continuous monitoring of plant health and growth. *Transact Am Soc Agric Eng* 44, 989-996.
- MARDEH AS, AHMADI A, POUSTINI K, MOHAMMADI V, 2006: Evaluation of drought resistance indices under various environmental conditions. *Field Crop Res* 98, 222-229.
- MATUZ J, CSEUZ L, FÓNAD P, PAUK J, 2008: Wheat breeding for drought resistance by novel field selection methods. Proc VII Alps-Adria Scientific Workshop, Stara Lesna, Slovakia. *Cereal Res Commun, Suppl* 36, 123-126.
- MOLNÁR I, GÁSPÁR L, SÁRVÁRI É, DULAI S, HOFFMANN B, MOLNÁR-LÁNG M, GALIBA G, 2004: Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Funct Plant Biol* 31, 1149-1159.
- WINTER SR, MUSICK JT, PORTER KB, 1988: Evaluation of screening techniques for breeding drought resistant winter wheat. *Crop Sci* 28, 512-516.

# Plant developmental patterns and environmental adaptation in barley

Ildikó Karsai<sup>1\*</sup>, Béla Kőszegi, Klára Mészáros, Zoltán Bedő and Ottó Veisz

## Abstract

The effects of various environmental factors on flowering and on the activities and interactions of the photoperiod sensitivity (*PPD*) and vernalization response (*VRN*) loci were examined applying systematic phenotypic characterization in controlled growth chamber tests, functional QTL and association analyses based on gene-specific primers. The experimental materials were two bi-parental mapping populations (facultative × spring, facultative × winter) and a multi-varietal population consisting of genotypes of different geographic origins and with various growth habits. Small modifications in the controlled environment conditions led to dramatic changes in the flowering time phenotype. A genetical dissection of these changes via QTL and association analyses revealed novel effects and interactions of barley *VRN* and *PPD* genes. We hypothesize that the phenotypic reactions given to low light intensity, to sub-optimal temperature and to the synchronous application of photo and thermo cycles are connected with the mechanism and action of the circadian rhythm, which, in turn, alter the activity and role of *PPD-H1*, *VRN-H2* and *VRN-H1* in a manner distinct from that attributable to vernalization and photoperiod duration.

## Keywords

Allele interactions, environmental cues, flowering, *Hordeum vulgare*, photoperiod, vernalisation

## Introduction

The regulation of flowering has been dissected and evaluated to the greatest extent in *Arabidopsis* and this information was an indispensable platform for rapidly isolating the homologues from cereal crops, but still much less is known about the genetic determinants of flowering in cereals. Up till now the candidate gene sequences and functions have mostly been identified for the major genetic determinants, the *VRN* (vernalization response) and the *PPD* (photoperiod sensitivity) loci (COCKRAM et al. 2007, TREVASKIS et al. 2007, DISTELFELD et al. 2009, GREENUP et al. 2009). The advantages of barley as a model plant species include its diploid genome and a wide range of flowering time and geographical adaptation strategies.

Most of the experiments for identifying the genetic components of flowering in cereals, whether with the aims of QTL, association analyses or gene expression studies, were

carried out under field or greenhouse conditions, where the various environmental factors could not be controlled completely and they acted in complex interactions. Controlled environment tests allow for trait dissection but usually a limited number of environmental cues are varied at a constrained number of levels due to the space and cost limitations. Thus the emphasis was laid mostly on the examination of the primary environmental cues, such as low temperature (vernalization response) and daylength (photoperiod response). Much less is known about the role of other environmental factors and about the signalling network through which they act. Controlled environmental tests makes it possible to dissect the complex environmental effects into individual factors (ambient temperature, light intensity, spectral composition of light, daily fluctuating factors) to study the effects of these individual factors on flowering and to identify the developmental genes, the activity of which are significantly influenced by the given environmental factor. The results of controlled environmental tests seem to prove that a small change in the parameters not affecting vernalization and photoperiod may result in dramatic variation in flowering time. However, these results underline the necessity of more careful set ups of experiments and cautious comparisons of the experimental data emerging from various environmental conditions, and they also represent challenge and possibility to identify and to better understand the regulation chains driven by various environmental cues and the interactions between major plant developmental genes. For this end it is of valuable contribution to carry out systematic characterisations of well-defined parental lines and progenies and sets of barley variety groups of different geographic origin and of various adaptation types under contrasting environments of field, greenhouse, controlled environments with constant conditions, and controlled environments with systematic introduction of varying conditions. These experimental designs make it possible to compare the effects of various treatments on the genetic determinants of flowering. This knowledge then may contribute to the manipulation of flowering without affecting major developmental requirements such as vernalization and photoperiodic response.

Thus, the aims of our research are to study the genetic determinants of flowering in barley through establishing the role of major flowering time loci, the effects of gene allele interactions and the role of various environmental factors as regulating cues. For this purpose a ‘genetical phenomics’ approach was applied, as we combined the functional mapping of the major genes (*VRN-H1*, *VRN-H2* and *VRN-H3* of vernalization response, and *PPD-H1* and *PPD-H2* of

<sup>1</sup> Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy, Brunszvik u. 2, 2462 MARTONVÁSÁR, Hungary

\* Ansprechpartner: Dr. Ildikó KARSAL, karsai@mail.mgki.hu

photoperiod sensitivity) of flowering, and the functional QTL analyses and association mapping with systematic phenotypic characterizations under various sets of environmental cues in controlled climatic chamber tests.

## Materials and methods

### Plant material

The cultivars Morex (M; spring), Dicktoo (D; facultative), and Kompolti korai (KK; winter) and the two DH mapping populations derived from the cross of D × M (DM) and D × KK (DK) used for these experiments have been well characterized at genotypic and phenotypic levels (PAN et al. 1994, KARSAI et al. 2005, 2006, 2007, 2008, von ZITZEWITZ et al. 2005, SZÜCS et al. 2006). The 169 barley varieties of the multi-varietal population originate from North and Central America (84), from Europe (75), from Asia (7) and Australia (3).

### Phenotypic characterization

Controlled environmental experiments were carried out in the Phytotron facilities of the Agricultural Research Institute, Martonvásár, using Conviron PGV type growth chambers (Conviron Ltd., Winnipeg, Canada). The technical parameters of the growth chambers, including light sources and control systems for temperature and light intensity, are detailed in KARSAI et al. (2004). The individual effects of the following environmental factors were examined: two levels of light intensity at two photoperiod regimes, two levels of ambient temperature, and the effect of daily fluctuating vs. constant temperatures. The combinations of various environmental cues used for testing the developmental patterns of each bi-parental and multi-varietal population and for carrying out functional QTL analyses are listed in Table 1.

In the multi-varietal population, for comparing the plant developmental patterns of the varieties under long photoperiod and constant ambient temperatures, the vernalization requirements of the winter barleys were saturated. The following

developmental phases were evaluated: beginning of tillering (DEV21 on Zadok's growth scale), first node appearance (DEV31), beginning of the extensive stem elongation (DEV30), flag leaf appearance (DEV37), heading (DEV49), end of the extensive stem elongation (SE\_E), and reaching the final plant height (PH\_final).

### Genotypic characterization

The DM linkage map consists of 165 loci of various types (e.g. AFLP, RFLP, SSR, STS and ASGTs (allele-specific gene tags) with a total recombination length of 1040 cM and an average marker spacing of 6.3 cM (PAN et al. 1994, SZÜCS et al. 2006). The DK linkage map consists of 236 loci of various types, with a total recombination length of 1107 cM and an average marker distance of 4.5 cM (KARSAI et al. 2005, 2007, SZÜCS et al. 2006). The *VRN-H1*, *VRN-H2*, *VRN-H3* and *PPD-H1*, *PPD-H2* loci were mapped, when possible with allele-specific primers in the DM and DK populations (KARSAI et al. 2005, TURNER et al. 2005, von ZITZEWITZ et al. 2005). Linkage maps were constructed using JoinMap 4.0 (VAN OOIJEN 2006). QTL analyses were performed using composite interval mapping (CIM) Model 6, with forward regression and backward elimination as implemented in WinQTL Cartographer v. 2.5 (WANG et al. 2007). Threshold levels were set using 500 permutations. For the multi-varietal population, the same allele-specific primers were used.

## Results

### Effect of *VRN-H1* on plant development in the absence of *VRN-H2*

In the Dicktoo × Morex population there is functional segregation in the *PPD-H1* locus, in addition to the *VRN-H1* functional polymorphism. These two loci were the major determinants of flowering in the various temperature treatments applied under long photoperiod (Table 2). Under all conditions the Dicktoo type winter allele in the *VRN-H1* locus, and the Morex type insensitive allele in the *PPD-H1* locus significantly delayed the plant development. Of the

Table 1: Lists of environmental factors studied in the bi-parental and multi-varietal populations

Photoperiod (hrs)	Temperature (°C)	Light intensity ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	DM	DK	Multi varieties
12	18 constant	340		+	
12	18 constant	170		+	
16	18 constant	340		+	
16	18 constant	220	+	+	
16	18 constant	170		+	+
16	18/16 thermo cycle	220	+	+	
16	10 constant	220	+		

Table 2: Effects of the *VRN-H1* and *PPD-H1* genes on flowering time in the Dicktoo × Morex mapping population under various temperature treatments

Temperature treatment		<i>VRN-H1</i>			<i>PPD-H1</i>		
		LOD	R <sup>2</sup>	Add. eff.	LOD	R <sup>2</sup>	Add. eff.
18°C	Constant	22.7	30.3	9	31.2	55.0	-12
18°C	Thermo cycle	22.3	41.6	24	12.0	17.2	-13
10°C	Constant	8.7	17.1	7	18.6	47.6	-12

**Table 3: Flowering time values of the four *VRN-H1*/*PPD-H1* allele classes of the Dicktoo × Morex mapping population and the two parents at the various temperature treatments**

<i>VRN-H1</i> / <i>PPD-H1</i> allele combination	Flowering time at			% of changes from 18°C constant temperature to	
	18°C constant temperature	18°C thermo cycle	10°C constant temperature	18°C thermo cycle	10°C constant
Dicktoo	36	128	61	356	169
DD/DD	38	84	60	221	159
DD/MM	75	121	89	161	119
MM/DD	30	44	53	148	176
MM/MM	45	66	71	145	157
Morex	41	54	70	132	171

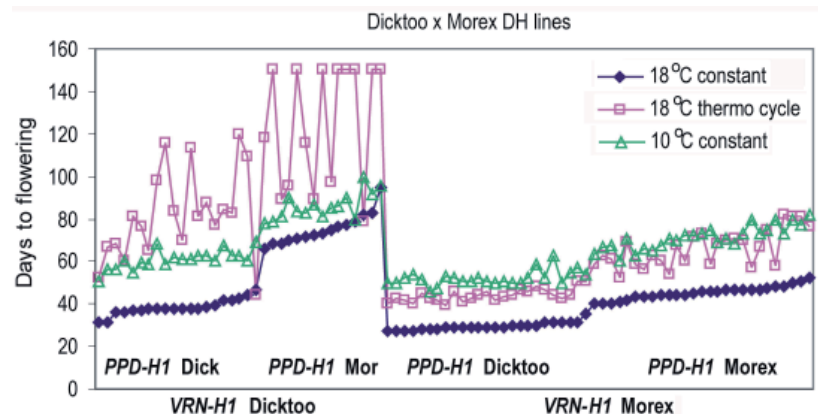
two genes, *VRN-H1* determined a greater proportion of the phenotypic variance at 18°C thermo cycle and *PPD-H1* at 18°C constant and at 10°C constant temperature treatments. Compared to the 18°C constant temperature, the application of thermo cycle increased the phenotypic effects of *VRN-H1*, while significantly decreased that of *PPD-H1* to a ratio of one-third. The low constant temperature of 10°C did not influence the effect of *PPD-H1* but significantly decreased the effect of the *VRN-H1* locus.

The combined effects of *VRN-H1* and *PPD-H1* explained most of the phenotypic variation in the experiments (two-locus  $R^2$  values were 83.5%, 74.0%, and 83.1% in the 18°C constant, 18°C thermo cycle, and 10°C constant treatments, respectively). As a result, the mean flowering times of lines with the parental allele combinations at the two loci were statistically the same as the respective parents under the two constant temperature treatments (18°C and 10°C) (Table 3). At 18°C thermo cycle, however, the DD (*VRN-H1*/*PPD-H1*) lines headed significantly earlier than Dicktoo (84 vs. 128 days, respectively), while the MM lines were significantly later than Morex (66 vs. 54 days, respectively). The non-parental allele combinations were responsible for the significant phenotypic transgressive segregation, which were apparent at each temperature treatment.

Lines with MD alleles at *VRN-H1*/*PPD-H1* headed significantly earlier, while lines with DM alleles at *VRN-H1*/*PPD-H1* headed significantly later than the parents and parental allele combinations. In addition, the reactions of the non-parental combinations to a sub optimal temperature or thermo cycle were significantly different from those of the parents or parental allele combinations. The MD (*VRN-H1*/*PPD-H1*) was the only subclass with a relatively uniform reaction to all the treatments including the thermo cycle, but its flowering was delayed to the largest extent by the sub-optimal temperature. Conversely, the sub-optimal temperature had the smallest delaying effect on the flowering of the DM (*VRN-H1*/*PPD-H1*) subclass, but the largest scattering was observed in this subclass when the thermo cycle was applied (Figure 1).

### Effect of *VRN-H1* on plant development in the presence of *VRN-H2*

In the Dicktoo × Kompolti korai population there is only functional polymorphism in the *VRN-H2* gene, all the lines

**Figure 1: Effect of sub-optimal temperature and synchronous photo and thermo cycles on major developmental genes in the Dicktoo × Morex mapping population**

carry the sensitive allele in the *PPD-H1* locus based on the SNP22 haplotype (TURNER et al. 2005). There was allelic variation at region of *VRN-H1* not known to affect phenotype and this variation allowed us to monitor allelic segregation at this locus. When the role of the two *VRN* loci in flowering time was examined, it was found that photoperiod, light intensity, and the application of thermo cycle influenced their activity (Table 4). When active, the presence of the *VRN-H2* gene and the Dicktoo type winter allele at *VRN-H1* delayed plant development, irrespective to the environmental composition.

Under a long photoperiod (16 h) *VRN-H2* explained the largest portion of the phenotypic variance irrespective of the light intensity. The *VRN-H1* gene alone was only a significant though minor source of variance under high light intensity. The two genes together contributed more than 90% of the variance at both light intensities ( $R^2$  high = 96.9%;  $R^2$  low = 91.9%). Light intensity had the strongest effect on the *VRN-H* genes under the 12 hr photoperiod regime, which represents the borderline between long and short photoperiod regimes. While the effect of *VRN-H2* was highly significant under high light intensity, the activity of this gene could not be detected when low light intensity was applied. The effect of *VRN-H1*, on the other hand, was tripled at low light intensity. Thus under a 12 hr photoperiod more than 50% of the phenotypic variance in the flowering time was explained by *VRN-H2* under high light intensity and by *VRN-H1* under low light intensity. The bi-locus effect was highly significant at both light intensities ( $R^2$  high = 78.8%;  $R^2$  low = 52.8%).

In comparing the effects of constant temperature and daily thermo cycle, *VRN-H2* had a very large effect on flowering

**Table 4: Effects of the *VRN-H1* and *VRN-H2* genes on flowering time in the Dicktoo × Kompolti korai mapping population under various environmental conditions**

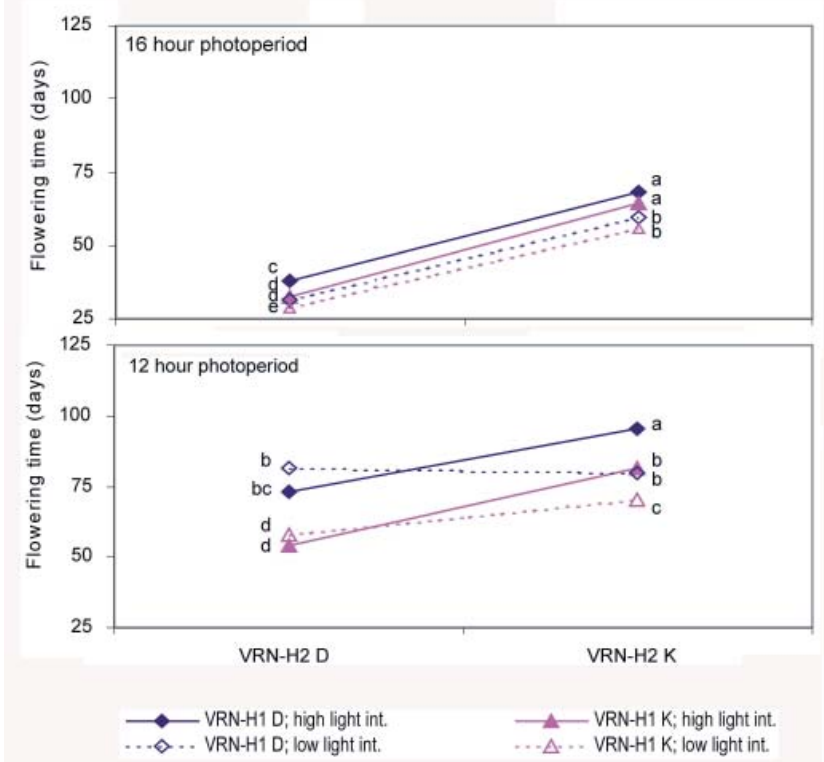
Treatments		LOD	<i>VRN-H1</i> R <sup>2</sup>	Add. eff.	LOD	<i>VRN-H2</i> R <sup>2</sup>	Add. eff.
Photoperiod and light intensity treatments							
16 hrs	340 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	5.1	2.0	3	32.8	89.6	-16
16 hrs	170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$		ns		32.3	70.3	-14
12 hrs	340 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	5.8	16.6	8	12.8	48.2	-14
12 hrs	170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	13.5	51.6	10		ns	
Temperature treatments							
18°C	Constant	3.7	3.2	3	34.5	63.8	-12
18°C	Thermo cycle	24.6	49.5	12	11.0	15.5	-7

time at 18°C constant temperature accounting for 64% of the phenotypic variance (Table 4). The *VRN-H1* locus had a significant effect under this condition, but it explained a very low portion of the phenotypic variance. The application of both light and thermo cycles resulted in a shift in the significance of the effects of these two loci: at 16T *VRN-H1* explained close to 60% of the phenotypic variance and *VRN-H2* only 16%.

As the bi-locus effects of the two *VRN-H* genes contributed the highest proportion of the phenotypic variance under 16 and 12 hr photoperiod regimes, the flowering characteristics of the four possible allele combinations were compared (Figure 2). Under a long photoperiod the light intensity did not influence the type or degree of interaction between the allele phases of the two *VRN-H* genes. The Kompolti allele in *VRN-H2* (presence of the gene) resulted in later flowering irrespective of the light intensity level applied and this effect was not modified by the allele composition of the *VRN-H1* gene. The lack of the *VRN-H2* gene caused earlier flowering and made the effect of the allele composition of *VRN-H1* significant under both light intensities. Under a 12 hr photoperiod, however, the light intensity exerted a strong modifying effect on the interaction between the two *VRN-H* genes. At high light intensity the interaction between *VRN-H2* and *VRN-H1* was similar to that observed for the 16 hr photoperiod, except that the importance of the *VRN-H1* allele composition increased. At low light intensity level, the quantitative effect of the *VRN-H2* gene in repressing flowering diminished significantly. The presence or absence of the *VRN-H2* gene only influenced flowering when the Kompolti korai allele was present in the *VRN-H1* gene. In the case of the Dicktoo *VRN-H1* allele, the *VRN-H2* gene had no apparent effect on flowering. When the effects of the two light intensities on flowering were compared under the 12 hr photoperiod regime, it became apparent that low light intensity only resulted in earlier flowering when the *VRN-H2* gene was present. In this case, however, its effect was mostly independent of the allele composition of *VRN-H1*.

Similar environment dependent interaction between the *VRN-H2* and *VRN-H1* genes was apparent in the comparisons of constant vs. daily fluctuating temperatures. *VRN-H2* and *VRN-H1* jointly accounted for most of the phenotypic variation, irrespective of growth condition: the two-locus R<sup>2</sup> values were 0.83 for 18°C constant temperature and 0.69 for 18/16°C thermo cycle. The average flowering times of lines with parental allele combinations at these two loci were statistically the same as respective parent under all the three conditions, with one exception. At 18°C constant temperature the average flowering of the DD lines was again significantly earlier than that of Dicktoo (86 vs. 109 days).

As shown in Figure 3, there is a pattern of growth condition-dependent epistasis between these two loci. Two features are noteworthy. First, the K allele at *VRN-H1* always resulted in



**Figure 2: Effects of photoperiod (12, 16 hr) and light intensity (high: 340  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , low: 170  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) on the association between the allele phases of the *VRN-H2/VRN-H1* genes in the Dicktoo (D) × Kompolti korai (K) mapping population, measured in terms of flowering time. (Within each photoperiod, data points labelled with the same letter were not significantly different from each other at the  $P=0.05$  level)**

significantly earlier flowering than the D allele, regardless of growth condition or allele phase of *VRN-H2*. Second, the winter allele (K) at *VRN-H2* delayed flowering, with one exception: under 18/16°C thermo cycle, the D allele at *VRN-H1* locus resulted in extremely delayed flowering irrespective of the allele phase at *VRN-H2*.

### Developmental patterns in the multi-varietal population

In the principal component analysis of the allele compositions of the 169 barleys the first factor showed a strong correlation with *VRN-H1* and *VRN-H2* in one direction and with *PPD-H1* and *PPD-H2* in the other direction underlining the higher probability of the parallel occurrences of some alleles. The putative spring and winter alleles at the *VRN-H3* locus showed a pattern more independent both from the sensitivity and growth habit groups. Taking into account the basic allele versions of the *VRN-H1*, *VRN-H2* and the two *PPD* loci, there are 16 possible allele classes. In this group of barley varieties, members belonging to 15 of these classes were identified, but the majority of them proved to represent rare combinations. There were only two classes, with frequencies higher than 10%. Of these two, the class containing 78% of the spring growth habit varieties was characterised with the dominant allele at *VRN-H1*, the recessive allele at *VRN-H2* and the insensitivity alleles at both *PPD-H* loci. The other frequent class containing 56.7% of the winter growth habit barleys could be characterized with the opposing allele combination as carried the recessive *VRN-H1*, and the dominant *VRN-H2* alleles and the sensitivity alleles at both *PPD-H* loci.

In this group of barley varieties, all the developmental phases were significantly determined by the *VRN-H* and *PPD-H* loci, together explaining more than 50% of the phenotypic variance. The only exception was the beginning of tillering. Of the loci, the allele phase in *VRN-H1* was the most significant determinant of the developmental patterns (its individual effect were between 29 and 53%), followed by *VRN-H2* (with individual effects between 22 and 38%) and the *PPD-H* loci (with individual effects between 11 and 32%), while the effect of *VRN-H3* was small, or not significant.

Comparing the developmental patterns of the *VRN-H1*, *VRN-H2* and *PPD-H1* classes, at the stage of first node appearance only two classes were significantly later, than the others, those which carried the winter alleles at both *VRN-H* loci. The time elapsed between first node appearance and the beginning of intensive stem elongation was the shortest in classes with the sensitive allele in *PPD-H1*, irrespective to the allele combination in the *VRN-H* loci. This difference between the insensitive and sensitive alleles remained throughout the further plant development. In addition, two other phenomena became evident. In the

presence of the dominant *VRN-H2* allele, heading followed the flag leaf appearance significantly earlier in the classes with the sensitive *PPD-H1* allele, irrespective to the allele composition in *VRN-H1*, while in the absence of the dominant *VRN-H2* allele, the extensive stem elongation phase reached its end sooner followed up the heading in classes with the sensitive *PPD-H1* allele, irrespective to the allele composition in *VRN-H1*. These two phenomena accentuated further the plant developmental fastening effects of the *PPD-H1* sensitive allele.

### Discussion

Gene expression, QTL and segregating population studies proved that the presence or absence of the vernalization critical region in the intron 1 of the *VRN-H1* gene basically determines the growth habit (FU et al. 2005, KARSAI et al. 2005, von ZITZEWITZ et al. 2005, KÓTI et al. 2006, SZÚCS et al. 2007). The spring allele (deletion of the vernalization critical region) shows complete dominance over the winter allele (YAN et al. 2004, DUBCOVSKY et al. 2006, KÓTI et al. 2006, SZÚCS et al. 2007). Our results emphasise, that in addition to determining the growth habit, the *VRN-H1* gene also quantitatively influences the flowering time, and that the *VRN-H1* gene is also subject to regulation by environmental stimuli other than low temperature vernalization. The site(s) of this additional regulation is partly different from that of the vernalization regulation site (KARSAI et al. 2005, KÓTI et al. 2006, SZÚCS et al. 2007). Photoperiod, low light intensity, the ambient temperature and the various combinations of daily fluctuating factors all practiced modifying effects on the *VRN-H1* gene in an allele specific way (von ZITZEWITZ et al. 2005, KARSAI 2008). The dominant spring allele showed greater sensitivity to the sub optimal temperature, while the synchronous photo and thermo cycles had the strongest effect on the recessive winter allele. In addition, significant differences were identified between the reaction types of two recessive winter alleles from the facultative

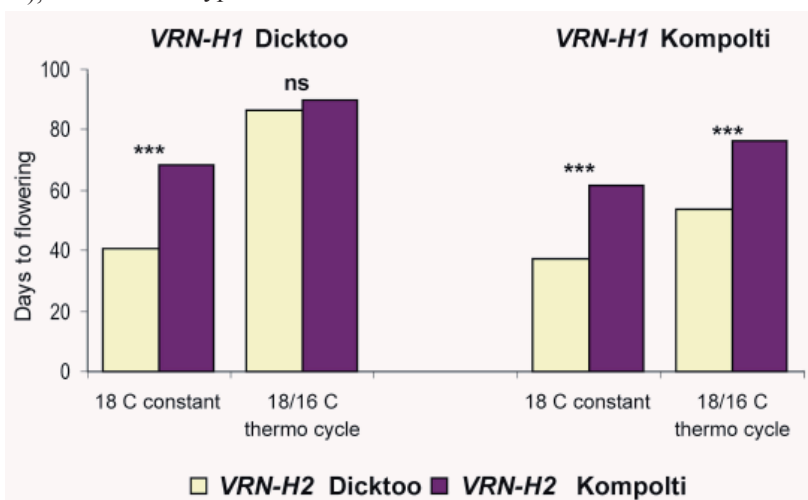


Figure 3: Effects of daily fluctuating environmental factors on the association between the allele phases of *VRN-H2* and *VRN-H1* genes in the Dicktoo × Kompolti korai mapping population

Dicktoo and from the winter Kompolti korai, which were completely the same in the vernalization critical region (von ZITZEWITZ et al. 2005). This may be due to as yet uncharacterised functional polymorphisms in other regions of the 17 kb gene. The Dicktoo type *VRN-H1* allele was more sensitive to the application of synchronous photo and thermo cycle than the Kompolti type allele. In addition, low light intensity differentially influenced the activating effect of the two parental recessive alleles on flowering under an intermediate photoperiod regime.

The various environmental factors influenced not only the activity of the *VRN-H1* gene, but also its specific interactions with the allele types of the *PPD-H1* and *VRN-H2*. The non-parental allele combinations in the *PPD-H1* and *VRN-H1* were responsible for the significant phenotypic transgressive segregation resulting in the early and late flowering genotypes (PAN et al. 1994, KARSAI et al. 1997). These combinations also showed specific reactions to the various environmental cues. The environmental dependent allele interactions were the most characteristic under the sub optimal temperature, and under the synchronous application of the photo and thermo cycle. There was also a pattern of growth condition-dependent epistasis between the *VRN-H2* and *VRN-H1* loci, which became evident under two growth conditions: applying low light intensity under an intermediate photoperiod regime, and the synchronous application of photo and thermo cycles.

In summary, the systematic phenotypic characterizations combined with functional QTL and association analyses proved to be efficient in identifying environmental factor dependent gene functions and allele interactions. Thus this approach produces valuable additional information to gene expression studies. The genetic dissection of the phenotypic changes via QTL and association analyses revealed novel effects and interactions of the barley *VRN* and *PPD* genes, different from that characteristic to them in the vernalization and photoperiod driven regulation pathways.

## Acknowledgements

This project was funded by the OTKA NK72913, OM-00047/2005 research grants and by the Bolyai János research fellowship grant of the Hungarian Academy of Sciences.

## References

- COCKRAM J, JONES H, LEIGH FJ, O'SULLIVAN D, POWELL W, LAURIE DA, GREENLANDAJ, 2007: Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. *J Exp Bot* 58, 1231-1244.
- DISTELFELD A, LI C, DUBCOVSKY J, 2009: Regulation of flowering in temperate cereals. *Curr Opin Plant Biol* 12, 1-7.
- DUBCOVSKY J, LOUKOIANOV A, FU D, VALARIK M, SANCHEZ A, YAN L, 2006: Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and *VRN2*. *Plant Mol Biol* 60, 469-480.
- FU D, SZÜCS P, YAN L, HELGUERA M, SKINNER JS, VON ZITZEWITZ J, HAYES PM, DUBCOVSKY J, 2005: Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol Genet Genomics* 273, 54-65.
- GREENUP A, PEACOCK WJ, DENNIS ES, TREVASKIS B, 2009: The molecular biology of seasonal flowering-responses in *Arabidopsis* and the cereals. *Ann Bot* 103, 1165-1172.
- KARSAI I, MÉSZÁROS K, HAYES PM, BEDŐ Z, 1997: Effects of loci on chromosomes 2(2H) and 7(5H) on developmental patterns in barley (*Hordeum vulgare* L.) under different photoperiod regimes. *Theor Appl Genet* 94, 612-618.
- KARSAI I, HAYES PM, KLING J, MATUS IA, MÉSZÁROS K, LÁNG L, BEDŐ Z, SATO K, 2004 Genetic variation in component traits of heading date in *Hordeum vulgare* subsp. spontaneum accessions characterized in controlled environments. *Crop Sci* 44, 1622-1632.
- KARSAI I, SZÜCS P, MÉSZÁROS K, FILICHKINA T, HAYES PM, SKINNER JS, LÁNG L, BEDŐ Z, 2005: The *VRN-H2* locus is a major determinant of flowering time in a facultative × winter growth habit barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population. *Theor Appl Genet* 110, 1458-1466.
- KARSAI I, MÉSZÁROS K, SZÜCS P, HAYES PM, LÁNG L, BEDŐ Z, 2006: The *VRN-H2* locus (4H) is influenced by photoperiod and is a major determinant of plant development and reproductive fitness traits in a facultative × winter barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population. *Plant Breed* 125, 468-472.
- KARSAI I, SZÜCS P, MÉSZÁROS K, PUSKÁS K, BEDŐ Z, VEISZ O, 2007 Barley (*Hordeum vulgare* L.) marker linkage map; a case study of various marker types and of mapping population structure. *Cereal Res Commun* 35, 1551-1562.
- KARSAI I, SZÜCS P, KŐSZEGI B, HAYES PM, CASAS A, BEDŐ Z, VEISZ O, 2008 Effects of photo and thermo cycles on flowering time in barley: a genetical phenomics approach. *J Exp Bot* 59, 2707-2715.
- KÓTI K, KARSAI I, SZÜCS P, HORVÁTH Cs, MÉSZÁROS K, KISS GB, BEDŐ Z, HAYES PM, 2006: Validation of the two-gene epistatic model for vernalization response in a winter × spring barley cross. *Euphytica* 152, 17-24.
- PAN A, HAYES PM, CHEN F, CHEN THH, BLAKE T, WRIGHT S, KARSAI I, BEDŐ Z, 1994: Genetic analysis of the components of winterhardiness in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 89, 900-910.
- SZÜCS P, KARSAI I, VON ZITZEWITZ J, COOPER LDD, GU YQ, CHEN THH, HAYES PM, ANDERSON O, SKINNER JS, 2006: Positional relationships between photoperiod response QTL and photoreceptor and vernalization genes in barley. *Theor Appl Genet* 112, 1277-1285.
- SZÜCS P, SKINNER JS, KARSAI I, CUESTA-MARCOSA, HAGGARD KG, COREY A, CHEN THH, HAYES PM, 2007: Validation of the *VRN-H2/VRN-H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN-H1* may account for a continuum of vernalization sensitivity. *Mol Genet Genomics* 277, 249-261.
- TREVASKIS B, HEMMING MN, DENNIS ES, PEACOCK WJ, 2007: The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends Plant Sci* 12, 352-357.
- TURNER A, BEALES J, FAURE S, DUNFORD RP, LAURIE DA, 2005: The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310, 1031-1034.
- YAN L, LOUKOIANOV A, BLECHL A, TRANQUILLI G, RAMAKRISHNA W, SANMIGUEL P, BENNETZEN JL, ECHENIQUE V, DUBCOVSKY J, 2004: The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* 303, 1640-1644.
- VAN OIJEN JW, 2006: JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma BV, Wageningen.
- VON ZITZEWITZ J, SZÜCS P, DUBCOVSKY J, YAN L, FRANCIA E, PECCHIONI N, CASAS A, CHEN TT, HAYES PM, SKINNER JS, 2005: Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. *Plant Mol Biol* 59, 449-467.
- WANG S, BASTEN CJ, ZENG ZB, 2007: Windows QTL Cartographer 2.5. Dept Statistics, North Carolina State Univ, Raleigh, NC [Available online: <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>; accessed 5 Jan 2010].



# Phänotypische und genetische Analyse der Frosttoleranz genetischer Ressourcen von Weizen unter Feldbedingungen

## Phenotypic and genetic analysis of frost tolerance of wheat genetic resources under field conditions

Jörg Leipner<sup>1\*</sup>, Alex Giraud<sup>2</sup>, Peter Stamp<sup>1</sup>, Beat Keller<sup>3</sup> und Caroline Plassé<sup>1</sup>

### Abstract

Frost tolerance is essential in wheat (*Triticum aestivum* L.) with rapidly fluctuating winter temperature in a changing climate. This study aimed to survey genetic resources for winter hardiness by investigating genetic and phenotypic diversity and by determining the genetic basis of frost tolerance by association mapping. The plant material was a set of 320 wheat accessions. A parametric genetic mixture analysis was conducted to analyze the population structure and identified twelve subpopulations. In order to characterize the frost tolerance, a subset of 103 accessions with contrasting genetic background were cultivated without snow cover in the French Jura in two winter seasons with a similar seasonal minimum temperature of about  $-30^{\circ}\text{C}$ . For the maximum quantum efficiency of photosystem II primary photochemistry ( $F_v/F_m$ ), leaf greenness and winter survival a large variation existed among the accessions and between the two winter seasons. The determination of  $F_v/F_m$  in combination with leaf greenness permitted a differentiation of the accessions in respect to their frost hardiness already at the beginning of winter. The gene *TaCBF12*, which codes for a transcription factor and seems to be located at the frost tolerance locus *Fr-A2* on chromosome 5A, was used as candidate gene. The sequence polymorphisms in the promoter region of this gene did not show an association with the traits analyzed, indicating that the genetic variation in *TaCBF12* does not play a major role in frost tolerance.

### Keywords

Association study, chlorophyll fluorescence, frost tolerance, *Triticum aestivum*, winter survival

### Einleitung

In den gemäßigten Klimazonen ist Frost einer der wichtigsten Faktoren, der die weitere Ausdehnung des Anbaus von Weizen (*Triticum aestivum* L.) verhindert. Eine Akklimatisierung an niedrige Temperaturen (unter ca.  $10^{\circ}\text{C}$ ) erhöht beim Weizen sowie bei anderen winterharten Getreidearten die Frosttoleranz. Hierbei spielt die Temperatur, die Licht-

intensität und die zeitliche Dauer der Akklimatisierung eine gewichtige Rolle. Dennoch sind Frostschäden verantwortlich für regelmäßige Ertragsseinbußen im Winterweizenanbau. Die Notwendigkeit die Frosttoleranz im Weizen zu verbessern wurde schon früh erkannt, jedoch konnte diese in den vergangenen Jahrzehnten nur marginal gesteigert werden (LIMIN und FOWLER 1991). Ein Grund dafür mag die relativ enge genetische Basis des Zuchtmaterials sein. Die geringere genetische Variation von Weizensorten, im Vergleich zu Material aus Genbanken, und die geringere genetische Variation in Regionen außerhalb des Ursprungsgebiets von Weizen (HUANG et al. 2002) scheint hier zum Tragen zu kommen.

Die Bestimmung der Auswinterungsrate unter natürlichen Bedingungen ist das am häufigsten genutzte Merkmal, um die Frosthärte zu bestimmen. Jedoch sind Beobachtungen der Auswinterungsrate unter Feldbedingungen oft wenig aussagekräftig, da es bei sehr strengen Frösten häufig zu einem Absterben aller untersuchten Pflanzen kommt oder, im umgekehrten Fall, alle Pflanzen in zu milden Wintern überleben. Um diese Problematik zu umgehen, wurden andere Parameter gesucht, die die Frosthärte vorhersagen können. Eine Reihe von biochemischen, physiologischen und morphologischen Merkmalen zeigte gute Übereinstimmung mit der im Feld bestimmten Auswinterungsrate, jedoch besaßen sie den Nachteil, dass es sich um destruktive Verfahren handelte (FOWLER et al. 1981). Ein großes Potential, um den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Funktion des photosynthetischen Apparates zu bestimmen, besitzt die Chlorophyll-Fluoreszenz-Analyse (FRACHEBOUD und LEIPNER 2003). Insbesondere das Verhältnis von variabler zu maximaler Fluoreszenz ( $F_v/F_m$ ), welches die maximale Effizienz der primären photochemischen Reaktionen am Photosystem II (PSII) beschreibt, erscheint als verlässlicher Parameter, um Schäden am photosynthetischen Apparat zu quantifizieren (BJÖRKMAN und DEMMIG 1987). Dieser Parameter zeigte eine enge Korrelation mit dem Elektrolytverlust, wenn Getreide Frost ausgesetzt waren (z.B. RIZZA et al. 2001). Es muss jedoch beachtet werden, dass  $F_v/F_m$  nicht nur aufgrund von Schädigungen am PSII sondern auch während der persistenten Herabregulierung des photosynthetischen Apparates im Rahmen der

<sup>1</sup> Institut für Pflanzenwissenschaften, ETH Zürich, Universitätstraße 2, CH-8092 ZÜRICH

<sup>2</sup> INRA, Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes, 17 rue Sully, BP 86 510, F-21065 DIJON

<sup>3</sup> Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich, Zollikerstraße 107, CH-8008 ZÜRICH

\* Ansprechpartner: Dr. Jörg LEIPNER, joerg.leipner@ipw.agrl.ethz.ch

Kälteakklimatisierung erniedrigt sein kann. Langanhaltende Frostperioden sind mit einer Abnahme des Chlorophyllgehaltes korreliert (HURRY et al. 1992), welcher somit auch zur Charakterisierung der Frosttoleranz unterschiedlicher Genotypen potentiell nutzbar ist.

Allele, die mit einer erhöhten Frosttoleranz assoziiert sind, sind interessante Kandidaten für markergestützte Selektion auf Frosttoleranz. Genotyp-Phänotyp Korrelationen können über Assoziationsstudien identifiziert werden. Neben der genomweiten Assoziationsstudie, welche eine extrem hohe Markerdichte voraussetzt, kann die genaue Haplotyp-Phänotyp-Assoziation auch für Kandidatengene bestimmt werden. Beide Verfahren setzen eine Einbeziehung und damit Bestimmung der Populationsstruktur voraus. Einen wichtigen QTL (Quantitative Trait Locus) für Frosttoleranz wurde auf Chromosom 5A in Weizen gefunden (VÁGÚJFALVI et al. 2003). Untersuchungen an *Triticum monococcum* zeigten, dass sich in dieser chromosomalen Region ein Cluster von 11 CBF (C repeat binding factor) Genen befindet (MILLER et al. 2006). Diese CBF Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der molekularen Antwort von Pflanzen auf abiotische Stressfaktoren und sind somit potentielle Kandidaten, die genotypische Variationen in der Frosttoleranz erklären könnten.

Ziel unserer Studie war es, genetische Ressourcen von Weizen phylogenetisch zu beschreiben und ein Subsample von wenig verwandten Akzessionen in Hinblick auf Frosttoleranz zu charakterisieren und die Haplotypen eines Kandidatengenes zu identifizieren, um eine Assoziationsstudie durchzuführen.

## Material und Methoden

### Pflanzenmaterial

Zweihundertachtundneunzig Weizenakzessionen (*Triticum aestivum* L.) wurden vom Agroscope Changins-Wädenswil (Schweiz) zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus wurden 22 Akzessionen der INRA Dijon (Frankreich) in die Studie aufgenommen. Das Pflanzenmaterial stammte von 40 Ländern und beinhaltete 153 Winter-, 72 Sommer- und 3 Wechselweizen; der Typus der restlichen 92 Akzessionen war nicht in der European Wheat Database (EWDB, <http://genbank.vurv.cz/ewdb>) katalogisiert.

### Phylogenetische Analyse

Dreiundzwanzig Mikrosatellitenmarker, welche 32 Loci detektierten, wurden aufgrund ihrer chromosomalen Lage ausgewählt und waren über das Genom verteilt. Dabei handelte es sich um 12 *Xgwm* Marker (IPK Gatersleben, Deutschland), 3 *Xwmc* Marker (Wheat Microsatellite Consortium), einen *Xbarc* Marker (USDA-ARS, Beltsville, USA) und 5 *Xcfa* Marker, einen *Xcfd* Marker und einen *Xgdm* Marker (INRA Clermont-Ferrand, Frankreich). Die genetische Diversität und Populationsstruktur wurde über ein Bayesian'sches Verfahren mit Hilfe des Programms Structure Vers. 2.2 bestimmt.

### Frosttoleranzbestimmung

Für die Bestimmung der Frosttoleranz wurden 103 Weizenakzessionen an der INRA Dijon, Versuchsstation Chaux des

Prés, Département Jura, Frankreich (46°30' N, 5°52' E, 875 m N.N.) angezogen. Die Aussaat erfolgte in der ersten Oktoberwoche 2004 und 2005. Die Bildung einer Schneedecke auf den Pflanzen wurde durch die Installation eines rollbaren Gewächshauses verhindert, welches bei Schneefall automatisch über die Versuchspartizelle gerollt wurde. In monatlichen Abständen wurde die Blattgrüne (SPAD 502, Minolta, Japan) und die maximale Effizienz der primären photochemischen Reaktionen am PSII,  $F_v/F_m$  (PAM 2000, Walz, Effeltrich, Deutschland) bestimmt. Die Auswinterungsrate wurde während des Wiederaufwuchses Anfang April festgestellt und diente zusammen mit der Bonitur der Blattschäden nach jedem starken Frost zur Bestimmung der Winterhärte nach GEVES (Groupe d'Étude et de contrôle des Variétés et des Semences) auf einer Skala von 1 bis 9 im Vergleich zu acht Standardlinien (LECOMTE et al. 2003).

### Assoziationsstudie

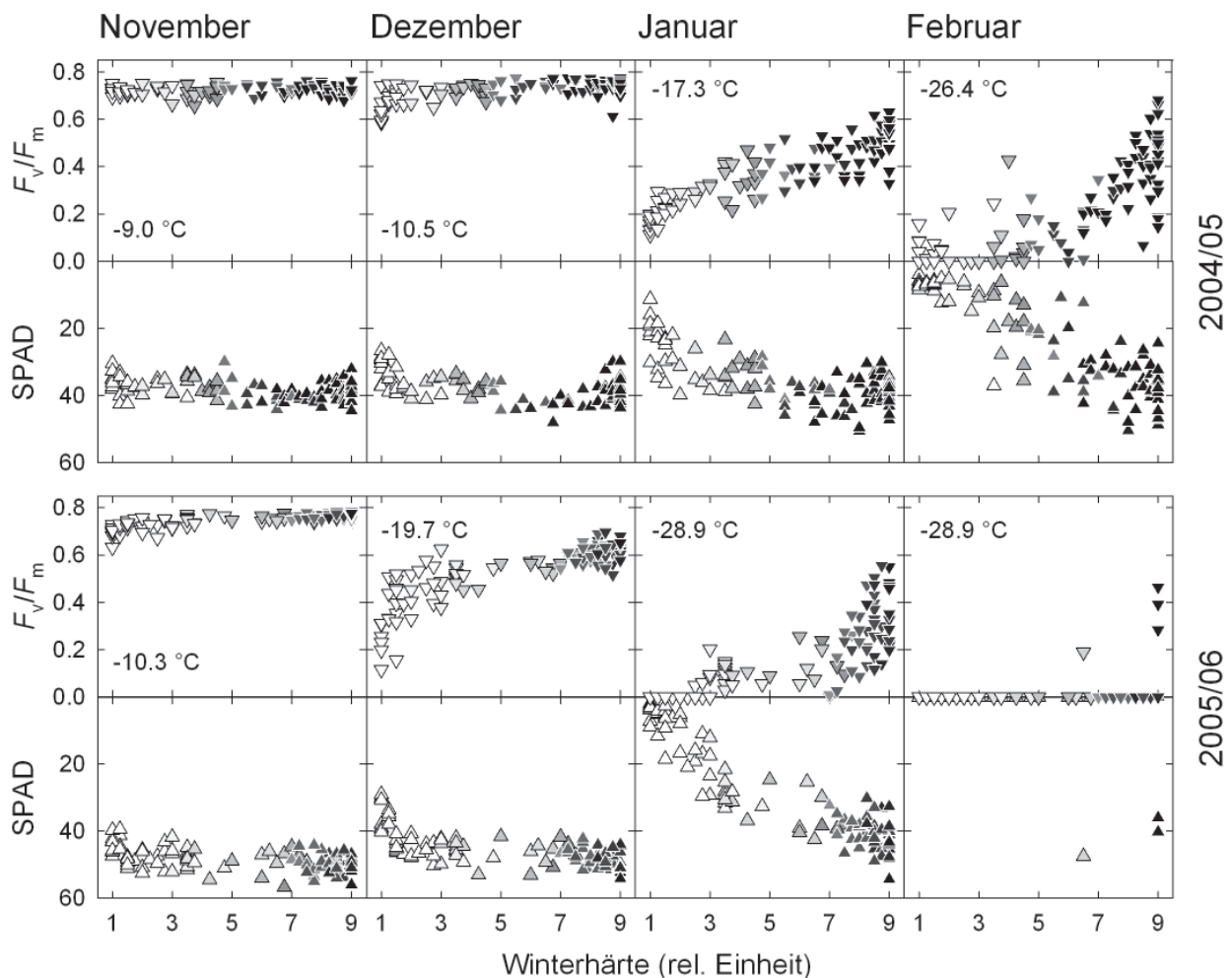
Die am *Fr-A2* Locus liegenden CBF Transkriptionsfaktoren (MILLER et al. 2006) wurden als Kandidatengene für die Assoziationsstudie gewählt. Basierend auf der Sequenz des *CBF12* Genes von *T. monococcum* (J. DUBCOVSKY, pers. Mitt.) wurden Primer entwickelt, die spezifisch für die homologe Region auf Chromosom 5A in hexaploiden Weizen waren. Die Promoterregion dieses Genes (*TaCBF12*) wurde in den 103 Weizenakzessionen sequenziert und diente der Assoziationsstudie, welche mit dem Programm TASSEL Vers. 2.0.1 durchgeführt wurde (BRADBURY et al. 2007).

## Ergebnisse

Die Untersuchung der genetischen Diversität an 32 Loci mit 23 SSR Markern ergab eine durchschnittliche Anzahl an Allelen von 10.3 pro SSR Locus. Die höchste genetischen Diversität unter den 320 Akzessionen wurde unter den südamerikanischen Akzessionen gefunden. Das Bayesian'sche Verfahren zur Bestimmung der Populationsstruktur identifizierte mit einer hohen Wahrscheinlichkeit 12 Subpopulationen. Die meisten dieser Subpopulationen beinhalteten hauptsächlich Akzessionen aus einer bestimmten Region oder bestanden zum großen Teil aus einer spezifischen Unterart.

Für die beiden Versuchsjahre wurden mit 28.4°C (2004/05) und 28.9°C (2005/06) ähnliche absolute Tiefsttemperaturen gemessen. Deutliche Unterschiede gab es jedoch im Temperaturverlauf. Während im ersten Winter (2004/05) nach einem milden Herbst die Temperatur sukzessive fiel und am 1. März 2005 ihr Minimum für diesen Winter erreichte, fiel die Temperatur im zweiten Winter (2005/06) nach einem warmen Herbst schneller und blieb, nachdem die saisonale Tiefsttemperatur am 30. Dezember 2005 gemessen wurde, für lange Zeit auf einem niedrigen Niveau.

Die 103 Weizenakzessionen wurden nach ihrer Winterhärte im Vergleich zu 8 Standardlinien klassifiziert. Akzessionen aus Australien, Südamerika und Südeuropa erwiesen sich als deutlich weniger frosttolerant als Akzessionen aus Nordamerika und aus Ost- und Nordeuropa. Während die Klassifizierung der Akzessionen in Bezug auf Winterhärte in beiden Wintern sehr ähnlich war ( $r^2=0.91$ ), zeigte sich



**Abbildung 1:** Abhängigkeit der maximalen Effizienz der primären Photochemie am PSII ( $F_v/F_m$ ) und der Blattgrüne (SPAD) von der Winterhärte (GEVES Skala) im Verlaufe der Versuchswinter 2004/05 und 2005/06. Dargestellt sind die Mittelwerte von 10 Wiederholungen. Die Farbe der Symbole repräsentieren die Auswinterungsraten von weiß (100%) bis schwarz (0%). Die absoluten Tiefsttemperaturen zwischen Feldaufbau und den entsprechenden Messtagen sind angegeben

**Figure 1:** Relationship between maximum quantum efficiency of photosystem II primary photochemistry ( $F_v/F_m$ ), leaf greenness (SPAD) and winter hardness (GEVES scale) throughout the two winter seasons (2004/05 and 2005/06). Values are means of 10 measurements. The accessions were coded on a grey scale according to their winter survival rate (white, 0% winter survival; black, 100% winter survival). The minimum temperature before measurements is indicated for each sampling date

ein starker Jahreseffekt bei der Auswinterungsrate. Den Winter 2004/05 überlebte eine deutlich höhere Anzahl an Akzessionen verglichen zum Winter 2005/06. Insbesondere Akzessionen mit einer moderaten Auswinterungsrate in 2004/05 zeigten eine hohe Auswinterungsrate in 2005/06.

Die maximale Effizienz der primären Photochemie am PSII ( $F_v/F_m$ ) und die Blattgrüne (SPAD) nahmen ab, wenn die Temperatur unter  $15^{\circ}\text{C}$  fiel. Dabei zeigte sich, dass  $F_v/F_m$  früher bzw. bei weniger tiefen Temperaturen reagierte als SPAD (Abbildung 1). Trotzdem zeigten beide Parameter ab dem Zeitpunkt, bei dem sie die Akzessionen diskriminieren konnten, eine gute Korrelation. Zu diesem Zeitpunkt korrelierten beide Parameter gut mit der Auswinterungsrate. Die unterschiedlich starke Reaktion von  $F_v/F_m$  und SPAD auf Frosttemperaturen spiegelte sich auch im zeitlichen Verlauf ihrer Korrelation zur Auswinterungsrate wieder (Abbildung 2). Am Ende des Winters, besonders am Ende des Winters

2005/06, zeigten viele Weizenakzessionen starke Nekrosen und konsequenterweise war SPAD und insbesondere  $F_v/F_m$  in diesen Pflanzen Null oder nahe Null.

Die Akzessionen konnten über eine hierarchische Clusteranalyse aufgrund des zeitlichen Verlaufs von  $F_v/F_m$  in vier Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe bestand aus Akzessionen mit einer hohen Auswinterungsrate in beiden Wintern. Die meisten Mitglieder dieser Gruppe waren hauptsächlich Sommerweizen von Südamerika, insbesondere aus Brasilien, und von Australien. Die zweite Gruppe zeigte eine niedrige im ersten (2004/05) und eine hohe Auswinterungsrate im zweiten Winter (2005/06). Sie bestand aus Akzessionen von Argentinien, Chile und Westeuropa. In der dritten Gruppe waren Akzessionen vertreten, die eine niedrige Auswinterungsrate in beiden Wintern zeigten. Interessanterweise beinhaltete diese Gruppe auch die Sommerweizen Porvenir (Uruguay) und Seewari 48 (Australi-

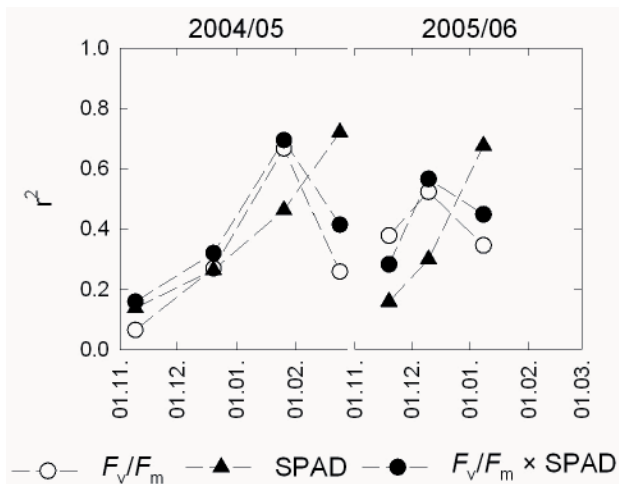


Abbildung 2: Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) für die Korrelationen zwischen Auswinterungsrate und der maximalen Effizienz der primären Photochemie am PSII ( $F_v/F_m$ ), der Blattgrüne (SPAD) und dem Produkt aus  $F_v/F_m$  und SPAD im Verlaufe der Winter 2004/05 und 2005/06

Figure 2: Coefficient of determination ( $r^2$ ) for the correlations between winter survival and maximum quantum efficiency of photosystem II primary photochemistry ( $F_v/F_m$ ), leaf greenness (SPAD) and the product of  $F_v/F_m$  and SPAD during the time course of winter 2004/05 and 2005/06

en). Die vierte Gruppe bestand aus drei Winterweizen, die eine extrem hohe Frosttoleranz zeigten; diese waren Ridit und Cheyenne (USA), sowie die Landsorte Wagrein 1371 (Österreich).

Die Promotorregion des Weizenhomologes vom Gen *CBF12* in *T. monococcum* wurde in den auf Frosttoleranz untersuchten Weizenakzessionen sequenziert. Zwei Haplotypen (*TaCBF12-a* und *TaCBF12-b*) wurden identifiziert. Diese Haplotypen unterschieden sich in neun vollständig assoziierten single nucleotide polymorphisms (SNPs). Diese Sequenzpolymorphismen zeigten jedoch keine eindeutige Assoziation mit den untersuchten Merkmalen der Frosttoleranz.

## Diskussion

Genetische Ressourcen sind von hohem Interesse für die Züchtung von stresstoleranten Kulturpflanzen. In dieser Arbeit wurden genetische Ressourcen von Weizen auf ihre Frosttoleranz untersucht. Das Projekt wurde in drei Schritten durchgeführt: (i) phylogenetische Charakterisierung eines umfangreichen Sets von Weizenakzessionen, (ii) Untersuchung der Frosttoleranz eines genetisch divergenten Subsets und (iii) Nutzung dieser phänotypischen Daten für eine Kandidatengen basierende Assoziationsstudie.

Die phylogenetische Charakterisierung des Weizenmaterials mit 23 Mikrosatelliten (SSR) Markern, welche 32 Loci detektierten, deckte ein hohes Grad an genetischer Variabilität im untersuchten Material auf. Die mittlere Anzahl an Allelen per Mikrosatellit war ähnlich wie in der Studie von RÖDER et al. (2002) an 500 europäischen Weizensorten. Die Bestimmung der Populationsstruktur über das Bayesian'sche Verfahren erwies sich als erfolgreich, da die

Gendiversität in den Gruppen kleiner war als in der Gesamtheit des Materials. Außerdem reflektierten die Gruppen geographische Herkünfte. Trotzdem wurde ein großes Maß an *Admixture* festgestellt, das aufgrund eines weltweiten Austauschs von Zuchtmaterial erklärt werden kann. Das breite genetische Spektrum spiegelte sich in der großen Variation der Frosttoleranz wider. Von einigen Sorten wie Vakka und Äring II (HÖMMÖ 1994) und insbesondere von Cheyenne (FOWLER und GUSTA 1979) konnte die schon bekannte gute Frosttoleranz bestätigt werden. Das Auftreten der beiden Sommerweizensorten Porvenir und Seewari 48 im frosttoleranten Material erscheint erstaunlich, könnte aber durch Missetikettierung in der Genbank begründet sein. Möglich wäre jedoch auch, dass eine Frosttoleranz erhalten blieb, da beide Sorten Winterweizen in ihren Pedigrees aufweisen.

Die Abnahme der maximalen Effizienz der primären Photochemie am PSII ( $F_v/F_m$ ) war eine erste Antwort auf den Frost. Bei frostsensitiven Akzessionen geschah diese schon bei Temperaturen von ca.  $-10^\circ\text{C}$ . Ob diese Abnahme von  $F_v/F_m$  das Ergebnis einer dauerhaften Herabregulierung von PSII oder einer Schädigung von PSII war, konnte nicht abschließend geklärt werden. Wahrscheinlich fand zunächst eine Herabregulierung des photosynthetischen Apparates statt. Bei stärkeren Frost akkumulierten reaktive Sauerstoffverbindungen, die letztendlich den photosynthetischen Apparat schädigten und zu einem Verlust der Blattgrüne führten. Das Ausmaß dieser Schädigungen war trotz ähnlicher Tiefsttemperaturen in beiden Versuchswinter unterschiedlich. Es ist bekannt, dass die Temperaturgeschichte einen großen Einfluss auf die Akklimatisation hat (FOWLER et al. 1999). Setzt man das mathematische Modell für die Frostakklimatisation und Frosttoleranz von FOWLER et al. (1999) für die beiden Versuchswinter ein, wird ersichtlich, dass die höhere Auswinterungsrate in 2005/06 durch die milden Temperaturen im Oktober und den starken Temperaturabfall im November und Dezember verursacht war. Eine weitere Ursache für die deutlich höhere Auswinterungsrate in 2005/06 kann in den lang anhaltenden und wiederkehrenden strengen Frösten zwischen Dezember und Mitte März liegen, da bekannt ist, dass die Dauer der Frostperiode einen Einfluss auf die Blattschäden hat (LECOMTE et al. 2003).

Im Winter 2005/06 stand die Auswinterungsrate im Einklang mit der Winterhärte nach der GEVES Skala; nur Akzessionen oder Standardsorten mit einem Winterhärtegrad von 9, welches einer Frosttoleranz von  $28^\circ\text{C}$  entspricht (LECOMTE et al. 2003), überlebten den Winter. Im Unterschied dazu überlebten den Winter 2004/05 Akzessionen mit einem Winterhärtegrad von 6.5, welches eine theoretische Frosttoleranz von  $-23^\circ\text{C}$  entspricht, obwohl die Temperatur auf Pflanzenhöhe bis auf  $-32^\circ\text{C}$  absank. Scheinbar kann Weizen nach einer optimalen Akklimatisation weit stärkere Fröste aushalten als unter „normalen“ Akklimatisationsbedingungen; die Geschwindigkeit mit der sich die Pflanzen akklimatisieren können, scheint hierbei von großer Bedeutung zu sein. Eine Akzession mit mittlerer Frosttoleranz, die sich scheinbar schnell akklimatisieren kann, ist die alte Sorte Cache aus den USA. Sie war im zweiten Winter sogar besser klassiert als im ersten.

Interessanterweise ist ein Elternteil von Cache die extrem frosttolerante Sorte Redit.

Eine weitere Charakterisierung des Materials in Hinblick auf die Frosttoleranz konnte erreicht werden, in dem regelmäßig physiologische Parameter bestimmt wurden. Die Clusteranalyse des zeitlichen Verlaufs von  $F_v/F_m$  ermöglichte es, die Akzessionen in vier distinkte Gruppen einzuteilen, die sowohl die maximale Frosttoleranz der Akzessionen als auch deren Akklimatisationsgeschwindigkeit widerspiegelte. Die regelmäßige Bestimmung der physiologischen Parameter kann in der Praxis einen großen Vorteil gegenüber der klassischen Aufnahme der Auswinterungsrate haben. Durch die Messung von  $F_v/F_m$  und SPAD konnte nämlich schon früh im Winter, als die Temperaturen noch nicht Werte unter  $-20^\circ\text{C}$  erreichten, das Material für seine Frosttoleranz diskriminiert werden. Diese Messungen ermöglichen es somit, auch an Standorten, an denen es nicht zur Auswinterung des Untersuchungsmaterials kommt, die Winterhärte zu charakterisieren.

QTL Analysen in einigen wenigen Kartierungspopulationen zeigten, dass für die Ausprägung der Frosttoleranz der Locus *Fr-A2* auf Chromosom 5A von großer Bedeutung zu sein scheint (VÁGÚJFALVI et al. 2003). Um eine allgemeingültige Aussage über die Bedeutung dieses Locus für die Winterhärte machen zu können, sind Assoziationsstudien notwendig. Das Gen *TaCBF12*, beziehungsweise dessen Promotorregion, wurde als Kandidatengen gewählt. MILLER et al. (2006) zeigten, dass in *T. monococcum* das Gen *CBF12* innerhalb eines Clusters von 11 *CBF* Genen im *Fr-A<sup>2</sup>* Locus liegt. Man kann daher davon ausgehen, dass *TaCBF12* am *Fr-A2* lokalisiert ist. Die Assoziationsstudie zeigte jedoch, dass die SNPs in der *TaCBF12* Promotorregion keine große Rolle in der genetischen Variation der Frosttoleranz zu spielen scheinen. Kleine oder epistatische Effekte können dennoch nicht ausgeschlossen werden.

## Literatur

- BJÖRKMAN O, DEMMIG B, 1987: Photon yield of  $\text{O}_2$  evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489-504.
- BRADBURY PJ, ZHANG Z, KROON DE, CASSTEVENS TM, RAMDOSS Y, BUCKLER ES, 2007: TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23, 2633-2635
- FOWLER DB, GUSTA LV, 1979: Selection for winterhardness in wheat. I. Identification of genotypic variability. *Crop Sci* 19, 769-772.
- FOWLER DB, GUSTA LV, TYLER NJ, 1981: Selection for winterhardness in wheat. III. Screening methods. *Crop Sci* 21, 896-901.
- FOWLER DB, LIMIN AE, RITCHIE JT, 1999: Low-temperature tolerance in cereals: Model and genetic interpretation. *Crop Sci* 39, 626-633.
- FRACHEBOUD Y, LEIPNER J, 2003: The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature, and drought stress. In: DeEll JR, Toivonen PMA (eds.), *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*, pp 125-150. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- HÖMMÖ LM, 1994: Hardening of some winter wheat (*Triticum aestivum* L.), rye (*Secale cereale* L.), *triticale* ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack) and winter barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars during autumn and the final winter survival in Finland. *Plant Breed* 112, 285-293.
- HUANG XQ, BÖRNER A, RÖDER MS, GANAL M, 2002: Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 105, 699-707.
- HURRY VM, KROL M, ÖQUIST G, HUNER NPA, 1992: Effect of long-term photoinhibition on growth and photosynthesis of cold-hardened spring and winter wheat. *Planta* 188, 369-375.
- LECOMTE C, GIRAUD A, AUBERT V, 2003: Testing a predicting model for frost resistance of winter wheat under natural conditions. *Agronomie* 23, 51-66.
- LIMIN AE, FOWLER DB, 1991: Breeding for cold hardiness in winter wheat - problems, progress and alien gene-expression. *Field Crops Res* 27, 201-218.
- MILLER AK, GALIBA G, DUBCOVSKY J, 2006: A cluster of 11 *CBF* transcription factors is located at the frost tolerance locus *Fr-A<sup>2</sup>* in *Triticum monococcum*. *Mol Genet Genomics* 275, 193-203.
- RIZZA F, PAGANI D, STANCA AM, CATTIVELLI L, 2001: Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. *Plant Breed* 120, 389-396.
- RÖDER M, WENDEHAKKE K, KORZUN V, BREDEMEIJER G, LABORIE D, BERTRAND L, ISAAC P, RENDELL S, JACKSON J, COOKE RJ, VOSMANN B, GANAL M, 2002: Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat cultivars. *Theor Appl Genet* 106, 67-73.
- VÁGÚJFALVIA, GALIBAG, CATTIVELLI L, DUBCOVSKY J, 2003: The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-tolerance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A. *Mol Genet Genomics* 269, 60-67.

# Selektion auf Frosttoleranz von Winterackerbohnen (*Vicia faba* L.): Methodenoptimierung und Ergebnisse

## Selection on freezing-tolerance of faba bean (*Vicia faba* L.): Improvement of methods and results

Franziska Roth<sup>1\*</sup> und Wolfgang Link<sup>1</sup>

### Abstract

Freezing-tolerance of winter faba bean is a component of winter-hardiness. The unpredictability of winter conditions hampers any field-based assessment of winter freezing-tolerance. Thus, at Göttingen we employ artificial freezing-tests. These experiments are conducted in a plant growth chamber. The well-established freezing methods were improved (e.g. optimization of vertical air flow, analysis of horizontal temperature distribution, modified temperature profile of the freezing-tests) ARBAOUI et al. 2008. Furthermore, new traits to assess freezing-tolerance were added. Based on these optimized artificial freezing-tests and on field trials from the seasons 2006/07 to 2008/09, the most frost and disease resistant winter faba bean lines were selected. This selection was based on a selection index, (composed of disposition to survive and regrowth after frost) and on susceptibility of the plants for *Ascochyta* and *Botrytis*. The best of 36 homozygous inbred lines were S4\_122, S5\_69, S4\_151. Their survival rates were about 90%. These lines were developed from the „Göttinger Winter Faba Bean Population“.

### Keywords

Artificial frost test, frost tolerance, *Vicia faba*, winter faba bean, winter hardiness

### Einleitung

Die Anbauflächen der in Europa einheimischen Körnerleguminosen und ihre Bedeutung in der Landwirtschaft ist seit Jahren rückläufig (SPECHT 2009). Im Gegensatz dazu ist die Anbaufläche von Sommerackerbohnen in den letzten zehn Jahren in ihren Hauptanbauregionen (Vereinigtes Königreich und Frankreich) leicht angestiegen und die der Winterackerbohnen blieb relativ stabil (SASS 2009). Winterackerbohnen zeichnen sich im Vergleich zu Sommerackerbohnen durch höhere Erträge bei früherer Reife aus (GHAOUTI 2007, LINK 2009). Weitere Vorzüge sind geringere Saatstärke, gute Unkrautunterdrückung - die vor allem im Ökologischen Landbau eine wichtige Rolle spielt - sowie höhere Ertragsstabilität durch Ertragsbildung vor Blattlaus- und Pilzbefall. Eine durch den fortschreitenden

Klimawandel zunehmend häufiger zu erwartende Wasserknappheit am Sommeranfang führt bei Winterackerbohnen zu geringeren Ertragsseinbußen als bei Sommerackerbohnen. Trotz dieser Vorteile werden in kontinentaleren Regionen Europas wie Deutschland, Österreich oder Polen fast keine Winterackerbohnen angebaut. Der Grund hierfür ist eine für diese Regionen bislang noch nicht ausreichende Winterhärte (LINK und ARBAOUI 2006). Frosttoleranz kann als ein Bestandteil der Winterhärte in Feldversuchen wegen der Unvorhersagbarkeit der jeweiligen Winterbedingungen nur unzureichend untersucht werden. Deshalb werden in Göttingen seit 2003 unter anderem Frostversuche mit Winterackerbohnen in einer Frostkammer durchgeführt. Die bisher erfolgreich etablierte Methode wurde technisch und hinsichtlich des Temperaturprofils verändert; neue Merkmale zur Evaluierung der frostresistentesten Winterackerbohnenlinien wurden entwickelt. Dadurch kann unter anderem mehr Pflanzenmaterial pro Saison getestet werden. Aus 36 Winterackerbohnenlinien wurden hier mit Hilfe dieser optimierten Frostkammermethode und mit Feldversuchen frost- und krankheitsresistente Winterackerbohnenlinien selektiert.

### Material und Methoden

#### *Pflanzenmaterial*

Das untersuchte Material umfasste 35 Inzuchtlinien aus der genetisch breiten Göttinger Winterackerbohnenpopulation sowie eine Kontrolllinie. Die Inzuchtlinien der Göttinger Winterackerbohnenpopulation setzten sich wie folgt zusammen: (1) Linien aus der Kreuzung von Côte d'Or/1 × BPL4628. Côte d'Or/1 ist eine Linie aus einer französischen Landsorte, BPL4628 eine chinesische Inzuchtlinie (ICARDA). Beide sind mit hoher Frosttoleranz ausgestattet (OLSZEWSKI und HERZOG 1994, DUC und PETITJEAN 1995); (2) Vertreter der Göttinger Winterackerbohnenpopulation (WAB, S4, S5). Als Kontrolle wurde eine Inzuchtlinie aus der französischen Sorte Diva (2002/Agri-Obtentions) verwendet (*Tabelle 1*). Das Material wurde in einer Frostkammer (Vötsch VB 4018 extra) sowie in Feldversuchen untersucht.

<sup>1</sup> Georg-August-Universität Göttingen, Department für Pflanzenbauwissenschaften (DNPW), Abteilung Pflanzenzüchtung, von Siebold-Straße 8, D-37075 GÖTTINGEN

\* Ansprechpartner: Franziska ROTH, franziska.roth@agr.uni-goettingen.de

**Tabelle 1: Prüfgliedliste der Winterackerbohnenlinien, die in Frostkammerversuchen getestet wurden****Table 1: List of faba bean lines analyzed in artificial freezing tests**

PG	Inzuchtlinie	PG	Inzuchtlinie	PG	Inzuchtlinie
4	(Cote d'Or/1-1 × BPL4628/1521.1)-5-4	25	S4_028	1	S4_230
5	(Cote d'Or/1-1 × BPL4628/1521.1)-18-3	6	S4_038	31	S4_232
23	(Cote d'Or/1-1 × BPL4628/1521.2)-20-3	7	S4_050	11	S4_244
3	(Cote d'Or/1-1 × BPL4628/1521.3)-40-3	19	S4_054	20	S4_253
12	(Cote d'Or/1-1 × BPL4628/1521.3)-41-3	27	S4_101	29	S4_268
28	(Cote d'Or/1-1 × BPL4628/1521.4)-52-3	17	S4_122	9	S5_29
10	(Cote d'Or/1-1 × BPL4628/1521.6)-95-3	15	S4_151	35	S5_69
33	WAB98_21 IL`04	26	S4_184	34	S5_151
22	WAB-EP02-Fam/S1_157-1-2-4-3	2	S4_191	16	S5_213
32	WAB-EP02-Fam/S1_159-1-2-4-1	13	S4_196	8	S5_252
14	WAB-EP02-Fam/S1_159-1-2-4-3	21	S4_221	36	S5_326
24	WAB-EP02-Fam/S1_159-1-2-4-3	30	S4_228	18	Diva-3

### Frostkammerversuche

Die Untersuchungen in der Frostkammer erfolgten analog der in Göttingen etablierten Methode (ARBAOUI et al. 2008). Diese Methode wurde technisch optimiert, indem eine bessere vertikale Durchlüftung ermöglicht, die horizontale Temperaturverteilung analysiert, die Versuchsanlage und Anordnung der Pflanzen in den Töpfen verändert (*Abbildung 1*), die Samenablage exakter definiert, Töpfe isoliert und das Temperaturprofil des Tests verändert wurden. Bisherige Merkmale der Frosttoleranz wurden um neue ergänzt.

Bei jedem der insgesamt drei Durchgänge in der Frostkammer wurden zwei Dreisatzgitter (9 × 4 Rechteckgitter) angelegt. Jeder Topf entsprach einem Teilblock und enthielt somit vier Prüfglieder, die mit je zwei Einzelpflanzen vertreten waren (*Abbildung 1*). Die Saat erfolgte in exakt standardisierter Ablage und Anordnung der Prüfglieder im Topf. Pro Durchgang wurden 54 Töpfe verwendet. Jeder war mit einer 5 kg Sand-Kompost-Mischung im Verhältnis 1:3 gefüllt. Die Töpfe wurden auf 70-80% der Wasserhaltekapazität eingestellt, die Luftfeucht in der Frostkammer betrug 80-90%. Die Töpfe wurden mit einer ca. 1 cm dicken Styroporisolierung versehen, um den in vorigen Versuchen beobachteten untypischen Erfrierungsverlauf der Wurzeln zu vermeiden (ROTH und RODE 2009, unveröffentlicht).

Die Anzucht der Prüfglieder erfolgte im Gewächshaus bei einer Temperatur von 15-20°C. Die anschließende Härtung der Pflanzen erfolgte in der Frostkammer zwei Tage bei 6°C tagsüber und 5°C nachts und neun Tage mit einer 1°C niedrigerer Temperatur (5°C/4°C). Der Tag-Nacht-Rhythmus war 10 zu 14 Stunden (Kurztag). Im Anschluss an die Härtung erfolgten die Frosttests, deren Temperaturprofil aus zwei Froststufen in zwei aufeinanderfolgenden Nächten bestand. Der Tag-Nacht-Rhythmus blieb identisch zur Härtungsphase. Der Frost erfolgte in der Nachtphase. Diese bestand aus einer sechsständigen Abkühlungsphase mit darauffolgender Frostphase (Frost I oder II), die vier Stunden konstant gehalten wurde. Es schloss sich eine Erwärmungsphase von vier Stunden auf die Tagtemperatur von 5°C an. In Tagphasen wurde immer eine Lichtintensität auf 200µmol/sm<sup>2</sup> programmiert. Die Pflanzen wurden einen Tag nach der zweiten Frostnacht aus der Kammer genommen und in ein Gewächshaus bei 10-15°C gestellt. Drei Tage nach Frost II wurden sie oberhalb des zweiten Nodiums abgeschnitten, um einheitliche Wiederaufwuchsbedingungen zu schaffen.



**Abbildung 1: Anordnung von vier Prüfgliedern (mit je zwei Einzelpflanzen) als Teilblock in einem isolierten Topf**

**Figure 1: Four faba bean lines (two plants per line) as a partial block in an insulated pot**

Während der insgesamt 60-tägigen Versuchsdauer wurden folgende Merkmale erfasst bzw. bonitiert: Laubblattanzahl und Pflanzhöhe am Tag vor Frost I, Turgeszenzverlust und Blattverfärbung am Ende der Tagphase nach Frost I und II sowie drei Tage nach Frost II, Frischmasseertrag nach dem Schnitt der Winterackerbohnen oberhalb des zweiten Nodiums, Überlebensrate der Pflanzen und die Frischmasse ihres Wiederaufwuchses (Versuchsende am Tag 60), Überlebenszeit (täglich).

Bei frostunabhängigen Merkmalen (Laubblattanzahl, Pflanzhöhe, Frischmasseertrag) wurden nach den Gitteranalysen die gitteradjustierten Mittelwerte verwendet, um eine weitere Varianzanalyse und eine Kovarianzanalyse durchzuführen. Bei Betrachtung der frostabhängigen Merkmale Wiederaufwuchs, Überlebensrate und Überlebensneigung bestätigte sich die vorliegende Erfahrung, dass die horizontale Temperaturverteilung in der Kältekammer nicht homogen ist. Die äußeren Topfreiheiten erfahren mehr Frost als die inneren. Die Ausprägung der Frostschäden der Pflanzen zeigen einen Zusammenhang mit den logarithmierten (ln) Topfkoordinaten (Position in der Kammer, X1 und X2). Deshalb wurden diese drei Merkmale (statt eine Adjustierung

mittels Gitteranalyse durchzuführen) mittels eines anhand der Topfkoordinaten (von aussen nach innen) errechneten Korrekturwertes adjustiert. An jeder Topfposition wurde ein Merkmalsmittel über alle Durchgänge errechnet. Dann wurde die Abhängigkeit der Ergebnisse von der Position als Abhängigkeit von den logarithmierten Topfkoordinaten (Reihe X1, Spalte X2) mittels einer Regression beschrieben:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \times \ln(X1) + \beta_2 \times \ln(X2)$$

Diese Regressionen führten zu R<sup>2</sup>-Werten der drei Merkmale von 0,49 < R<sup>2</sup> < 0,63 (Tabelle 2). Der R-prozentuale Anteil der Differenz des Prüfgliedwertes zum (aufgrund Topfposition mittels Regression vorhergesagten) Positionswert wurde für die Adjustierung verwendet.

Die frostabhängigen Merkmale Verfärbung und Turgeszenzverlust wurden analog der frostunabhängigen Merkmale verrechnet, da sich für diese Merkmale keine deutlichen Positionseffekte in der Kammer ergaben. Alle statistischen Analysen erfolgten mit PLABSTAT (UTZ 2004, 2007) bzw. mit PLABCOV (UTZ 1994). Die Berechnung der Korrelationen erfolgte ebenfalls mit PLABSTAT. Um nicht auf die Normalverteilung der Daten angewiesen zu sein (was bei den bonitierten Merkmalen nicht zutrifft) wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman verwendet, wie er in der BASIC-Routine in PLABSTAT implementiert ist. Für die Selektion der kältetolerantesten Winterackerbohnenlinien wurde aus den Ergebnissen der Kovarianzanalyse ein Optimums-Index gebildet, der aus dem Hauptmerkmal der Überlebensneigung (s.u.) und dem Hilfsmerkmal des Wiederaufwuchses besteht. Die Berechnung der Indekskoeffizienten erfolgte nach BAKER (1986); das Hilfsmerkmal erhielt ein ökonomisches Gewicht von Null. Der resultierende Index lautete:

$$Index_{Frostkammer} = 0,5611 \times \text{Überlebensneigung} + 1,1436 \times \text{Wiederaufwuchs}$$

### Feldversuche

Die 36 in der Frostkammer getesteten Winterackerbohnenlinien wurden 2006-2009 im Beobachtungsanbau mit weiteren Winterackerbohnenlinien am Versuchsstandort Göttingen, Reinshof untersucht. Im Versuchsjahr 2006/07 wurden sie mit weiteren 364 Prüfgliedern einfach wiederholt (r=1) angebaut. 2007/08 standen sie mit r=4 Wiederholungen und 2008/09 mit r=2 Wiederholungen jeweils in einer 12x16 Gitteranlage. Es erfolgten in jedem Jahr Bonituren zur Überwinterung (Feldaufgang, Pflanzenanzahl, Bestand), Blühbeginn, Krankheiten (Ascochyta, Botrytis, Mehltau), Biomasse, Wuchshöhe, Lager und Reife. Desweiteren wurde der Kornertrag erhoben. Auswinterung gab in diesen drei Jahren kaum. Die statistische Verrechnung erfolgte für alle drei Versuchsjahre mit PLABSTAT. Daten des einfach

**Tabelle 2: Regressionskoeffizienten dreier frostabhängiger Merkmale nach multipler Regression auf die logarithmierten Topfkoordinaten**

**Table 2: Coefficient of regression between three frost-affected traits after multiple regression on the logarithm of pot coordinates**

Merkmal	Regressionskoeffizienten <sup>1</sup>			R <sup>2</sup> (%)
	$\beta_0$	$\beta_1$	$\beta_2$	
Wiederaufwuchs (g)	3,112	2,665	1,573	62,72
Überlebensrate (%)	31,44	22,01	13,79	49,02
Überlebensneigung (°)	58,05	10,78	6,498	51,21

<sup>1</sup> der unabhängigen Variablen: Topfkoordinaten ln(X1) und ln(X2)

wiederholten Versuchs 2006/07 wurde mit Hilfe des gleitenden Mittelwertverfahrens adjustiert. Die Daten der beiden mehrfach wiederholten Versuche 2007/08 und 2008/09 wurden gitteradjustiert. Nach den Adjustierungen erfolgte eine Varianzanalyse über die drei Versuchsjahre und alle gemeinsamen Prüfglieder.

## Ergebnisse und Diskussion

### Frostkammerversuche

Die mittlere Überlebensrate der Winterackerbohnen nach 60 Tagen im Durchgang A betrug 72,9% nach den beiden Frostnächten mit -13°C und -15,5°C (Tabelle 3). In den folgenden Durchgängen wurde die Temperatur der zweiten Frostnacht auf -17,5°C erniedrigt, um eine bessere Differenzierung der Linien zu erhalten. Über alle Durchgänge hinweg konnte so eine mittlere Überlebensrate von 68,9% und eine mittlere Überlebensneigung (s.u.) von 76° erreicht werden.

Die frostunabhängigen Merkmale Wuchshöhe sowie Laubblattanzahl zeigten, dass das verwendete Pflanzenmaterial sehr homogen war: die Laubblattanzahl bei Testbeginn (Abbildung 1) der Winterackerbohnen variiert kaum. Die Wuchshöhe der Winterackerbohnen weist etwas größere Unterschiede auf. Es gibt keine Korrelation dieser Merkmale zur Überlebensrate (Tabelle 4). Obwohl es möglich ist Sommer- und Winterackerbohnen anhand des Wuchstypes voneinander zu unterscheiden, ist es nicht möglich Winterackerbohnenlinien allein mit Hilfe des Wuchstypes auf Kältetoleranz zu selektieren, da die Variation innerhalb der Winterackerbohnen zu gering ist. Es muss somit auf Merkmale der Frostkammerversuche oder andere Merkmale zurückgegriffen werden, um die kältetolerantesten Linien zu identifizieren.

Die frostabhängigen Merkmale Turgeszenzverlust und Verfärbung korrelieren erst nach dem zweiten Frost signifikant mit der Überlebensrate und Überlebensneigung (Tabelle 4).

**Tabelle 3: Minimumtemperaturen, Mittlere Überlebensrate nach 60 Tagen und Mittlere Überlebensneigung über alle 36 Winterackerbohnenlinien und Durchgänge der Frostkammerversuche**

**Table 3: Minimum temperatures, mean survival rate after 60 days and mean disposition to survive over all 36 winter faba bean lines and over the chamber loads of the artificial freezing tests**

Durchgang	Minimum-Temperatur Frost I (°C)	Minimum-Temperatur Frost II (°C)	Überlebensrate (%)	Überlebensneigung (°)
A	-13	-15,5	72,9	77,3
B	-13	-17,5	70,7	79,4
C	-13	-17,5	63,0	71,3



**Tabelle 4: Spearman Rangkorrelationen zwischen allen erhobenen Merkmalen der Frostkammerversuche (WHOE, Wuchshöhe; LBL, Laubblätter; TURGI-3, Turgor I-III; FARBI-3, Farbe I-III; FMERT, FM Ertrag; ULNEIG, Überlebensneigung; ULRATE, Überlebensrate; WAUF, Wiederaufwuchs)**

**Table 4: Spearman's rank correlation coefficient of the traits of the artificial freezing tests (WHOE, plant height; LBL, leaves; TURGI-3, turgor I-III; FARBI-3, colour I-III; FMERT, FM yield; ULNEIG, disposition to survive; ULRATE, survival rate; WAUF, regrowth after frost)**

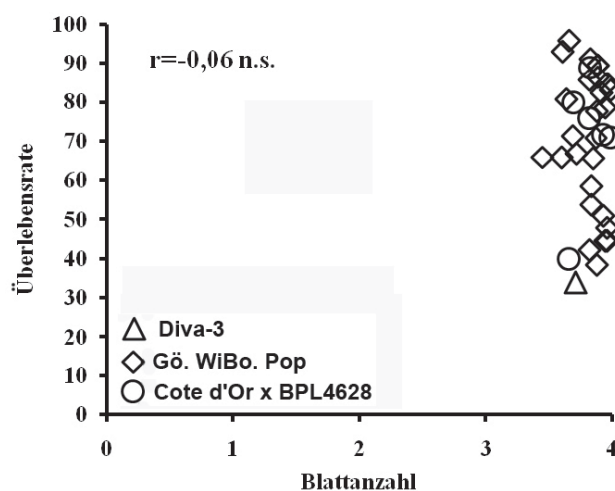
	WHOE <sup>1</sup>	LBL <sup>1</sup>	TURGI	FARBI	TURGII	FARBII	TURG	FARBIII	FMERT <sup>1</sup>	ULNEIG	ULRATE
LBL	-0,088										
TURGI	0,178	0,091									
FARBI	-0,060	-0,070	0,418 *								
TURGII	0,490 **	0,188	0,595 **	0,096							
FARBII	0,084	0,066	-0,090	-0,068	0,037						
TURGIII	0,628 **	0,067	0,160	-0,090	0,744 **	0,242					
FARBIII	0,351 *	0,082	-0,107	-0,152	0,266	0,561 **	0,624 **				
FMERT	0,433 **	0,121	0,731 **	0,181	0,596 **	-0,240	0,276	0,002			
ULNEIG	-0,356 *	-0,010	-0,093	0,016	-0,442 **	-0,414 *	-0,646 **	-0,637 **	-0,161		
ULRATE	-0,325	-0,060	-0,056	0,059	-0,394 *	-0,446 **	-0,598 **	-0,622 **	-0,138	0,971 **	
WAUF	-0,034	-0,020	-0,024	-0,015	-0,100	-0,443 **	-0,287	-0,484 **	0,159	0,763 **	0,793 **

<sup>1</sup> Frost unabhängige Merkmale (frost independent traits)

\*, \*\* Signifikanzniveau 0,05 bzw. 0,01 (significance 0.05 and 0.01, respectively)

Im Gegensatz zu früheren Versuchen (ARBAOUI et al. 2008) wurde vor allem bei dem Merkmal Verfärbung die Boniturskala nach oben nicht voll ausgeschöpft. Es gab keine Pflanzen, die alle Blätter und den Stängel verfärbt hatten (Boniturnote 4). Auch das Umkippen der Pflanzen durch zu niedrigen Turgor konnte nicht beobachtet werden. Diese Merkmale ermöglichen im Zusammenhang mit dem hier verwendeten Temperaturprofil nur begrenzt Aussagen über die Kältetoleranz der Winterackerbohnenlinien. Folglich sollte das Augenmerk zur Selektion der frosttolerantesten Winterackerbohnenlinien auf die Überlebenszeit der Pflanzen und die Überlebensrate nach 60 Tagen gerichtet werden.

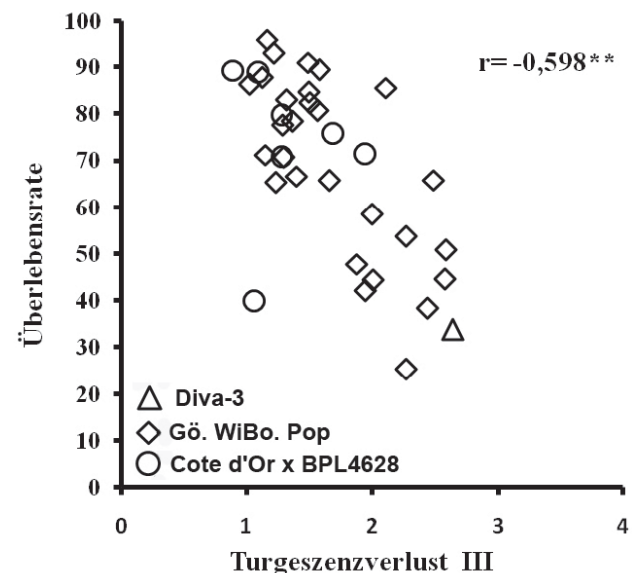
Die Merkmale Überlebenszeit und Überlebensrate, die Aussagen über die Frosttoleranz der Winterackerbohnen ermöglichen, weisen folgende Stärken und Schwächen auf



**Abbildung 2: Überlebensrate (%) (GD5%=27,46) und bonitierter Anzahl der Laubblätter (GD5%=0,37) von 36 Winterackerbohnenlinien der Frostkammerversuche vor Frost I**

**Figure 2: Survival rate (%) (LSD5%=27.46) and scored number of leaves (LSD5%=0.37) of 36 winter faba bean lines analyzed during artificial freezing tests, before freezing step I.**

(Tabelle 5): Durch Erfassen des Tages, an welchem eine Einzelpflanze als tot erkannt wurde, kann jeder toten Pflanze eine *Überlebenszeit* (Tage ab der zweiten Frostnacht) zugewiesen werden. Pflanzen, die zu Versuchsende als lebend betrachtet werden haben keinen bekannten Todestag, also keine Überlebenszeit. Dies gilt sowohl für Pflanzen, die nach mehr als 60 Tagen noch an Frostfolgen sterben würden, als auch für diejenigen, die den Frost dauerhaft überleben würden. Eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Pflanzengruppen (Linien) hinsichtlich ihres Überlebens ist nicht gegeben. Das Merkmal Überlebenszeit liefert in beiden Fällen keinen Wert. Dadurch liegt kein vollständiger



**Abbildung 3: Überlebensrate (%) (GD5%=27,46) und bonitierter Turgeszenzverlust (GD5%=0,57) von 36 Winterackerbohnenlinien der Frostkammerversuche drei Tage nach Frost I (\*\*, Signifikanzniveau 0,01)**

**Figure 3: Survival rate (%) (LSD5%=27.46) and loss of turgidity (LSD5%=0.57) of 36 winter faba bean lines analyzed during artificial freezing tests, three days after freezing step I (\*\*, significance level 0.01)**

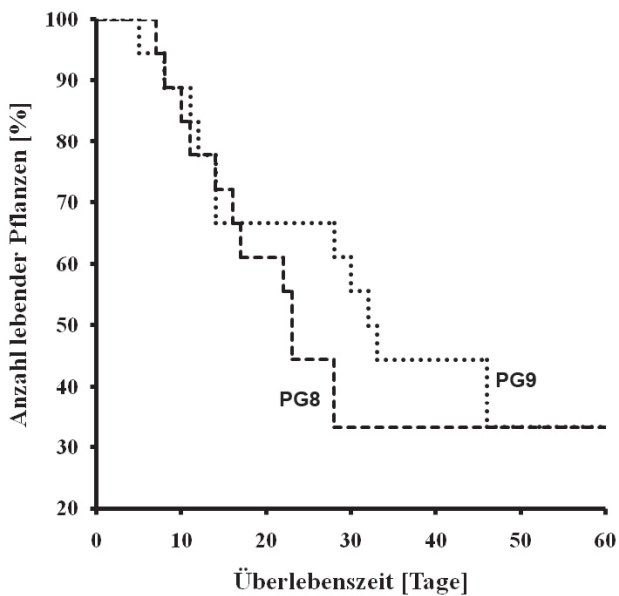


Abbildung 4: Sterbeverlauf der beiden Winterackerbohnenlinien S5\_252 (PG 8) und S5\_29 (PG 9) nach Frostkammerbehandlung bis zum 60. Tage (Versuchsende) in Form von Überlebenskurven

Figure 4: Survival curve of two winter faba bean lines, S5\_252 (PG 8) and S5\_29 (PG 9), after artificial freezing tests until day 60 (end of test)

Datensatz vor; dieses Merkmal ist mit der klassischen Methode der Varianzanalyse nicht verrechenbar. Der für eine Winterackerbohnenlinie typische Sterbeverlauf kann z.B. mit Hilfe einer Kaplan-Meier Kurve für Überlebenszeiten dargestellt werden. Unterschiedliche Sterbeverläufe in Abhängigkeit der jeweiligen Linie (Pflanzengruppe) sind beim Vergleichen der Kurven erkennbar (Abbildung 4).

Das Merkmal *Überlebensrate* ergibt im Gegensatz dazu Werte für tote und lebende Pflanzen (tote Pflanzen = 0%; lebende Pflanzen = 100%). Damit hat jede Pflanzengruppe einen Wert für die Überlebensrate, der sich als Mittelwert der Einzelpflanzenwerte errechnet. Im Gegensatz zur Überlebenszeit ermöglicht die Überlebensrate keine Aussagen über mögliche Unterschiede der Sterbeverläufe der Gruppen (Tabelle 5).

Da die beiden primären Merkmale Überlebenszeit und Überlebensrate einzeln betrachtet nicht ausreichen, um Aussagen über überlebende Pflanzen und den für eine Linie typischen Sterbeverlauf zu erhalten, wurde das sekundäre Merkmal Überlebensneigung zur Versuchsauswertung verwendet. Die *Überlebensneigung*  $\alpha_{xi} = \arctan(x_i / x_m)$  wird aus der Überlebenszeit  $x_i$  sowie der Mittleren Überlebenszeit  $x_m$  aller zu Versuchsende als gestorben bonitierten Pflanzen im rechtwinkligen, gleichschenkligen Dreieck errechnet (Abbildung 5, A). Es gilt im Dreieck:  $\alpha_{xm} = 45^\circ = \text{Höhe } h$  (Abbildung 5, B). Pflanzen, die zum Zeitpunkt des Versuchsendes ( $x_{60}$ ) nicht als tot bonitiert wurden, erhalten den Wert  $\alpha_{60} = 90^\circ$  (Abbildung 5, C, D).

Pflanzen, die nicht an Frostfolgen sterben und solche die erst nach mehr als 60 Tagen an Frostfolgen sterben würden, werden identisch behandelt. Es entsteht mittels dieser Transformation ein vollständiger Datensatz. Da die Überlebensneigung ein Winkel ist wird sie in Grad ( $^\circ$ ) angegeben.

Der Vorteil des neuen Merkmales Überlebensneigung liegt darin, dass im Gegensatz zur Überlebenszeit ein vollständiger Datensatz zur statistischen Verrechnung vorliegt. Informationen über überlebende und tote Einzelpflanzen sowie den Sterbeverlauf sind im Merkmal Überlebensneigung ebenfalls enthalten. Die Korrelation der Überlebensneigung und der Überlebensrate ist mit  $r=0,971$  sehr hoch (Abbildung 6). Dennoch sollte beachtet werden, dass sie von  $r=1$  verschieden ist, da sie eine Transformation der Überlebenszeit und nicht der Überlebensrate ist. Die Überlebensneigung aller als lebend bonitierten Pflanzen ist  $90^\circ$ . Das Merkmal Wiederaufwuchs erlaubt nun innerhalb dieser Gruppe eine Differenzierung. Es wird angenommen, dass Pflanzen, die die geringsten Frostschäden aufweisen den höchsten Wiederaufwuchs zeigen.

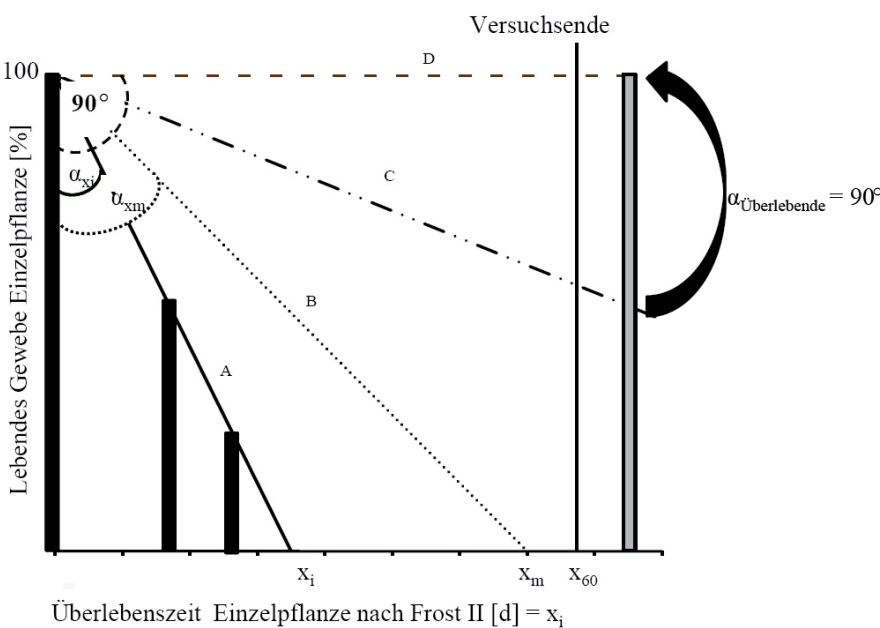


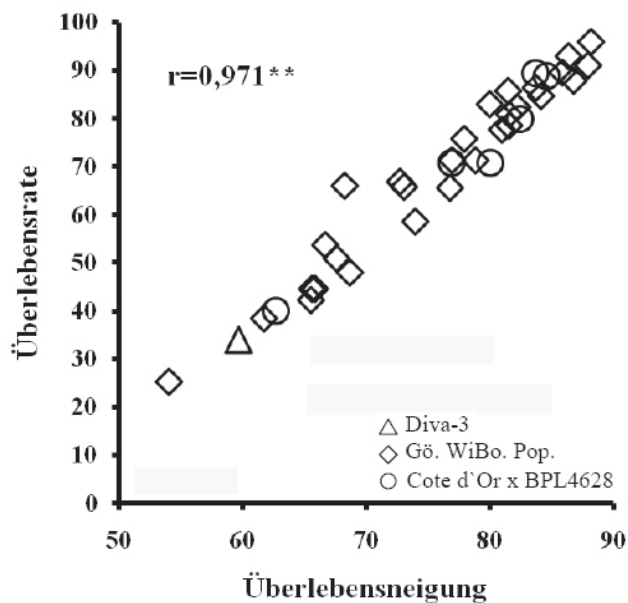
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Sterbeverlaufs von Einzelpflanzen und daraus abgeleiteter Überlebensneigung  $\alpha_{xi}$ . A: Pflanze, die zum Zeitpunkt  $x_i$  als tot bonitiert wird. B: Pflanze, die am Mittleren Überlebenstag aller Toten Pflanzen als tot bonitiert wird. C: Pflanze, die erst nach Versuchsende an Folgen des Frostes sterben würde. D: Pflanze, die den Frost dauerhaft überlebt. Die Angabe „Lebendes Gewebe Einzelpflanze“ (%) ist als Denkhilfe zu verstehen. Tatsächlich bonitiert wurde nur „lebt“ oder „tot“

Figure 5: Sketch of dying gradient of single plants, resulting in the disposition to survive  $\alpha_{xi}$ . A: Plant at time  $x_i$  scored as dead. B: Plant scored as dead at the mean surviving date of all dead plants. C: Plant that will die after end of the test. D: plant surviving the freezing test. The specification ‘living tissue of single plant’ (%) is given as comprehension assist; actually scoring was only ‘dead’ or ‘alive’

**Tabelle 5: Eigenschaften der während des Versuchs erhobenen Merkmale Überlebenszeit, Überlebensrate und Wiederaufwuchs und dem aus der Überlebenszeit transformierten Merkmal der Überlebensneigung**

**Table 5: Features of the traits survival time, survival rate, transformed trait disposition to survive and regrowth as assessed during the artificial freezing tests**

Merkmal	Einzelpflanzen		Pflanzengruppe	
	Wert für Gestorbene	Wert für Überlebende	Sterbeverlauf	Differenzierung der Überlebenden
Todeszeitpunkt/Überlebenszeit	+	-	+	-
Überlebensrate	+	+	-	-
Überlebensneigung	+	+	+	-
Wiederaufwuchs	+	+	-	+



**Abbildung 6: Überlebensrate (%) (GD=28,46) und Überlebensneigung (°) (GD=14,57) der 36 Winterackerbohnenlinien der Frostkammerversuche**

**Figure 6: Survival rate (%) (LSD5%=28.46) and disposition to survive of 36 winter faba bean lines analyzed in the artificial freezing tests.**

Nur bei fünf der 36 untersuchten Winterackerbohnenlinien starben bis zum sechzigsten Tag mehr als die Hälfte der Pflanzen. Auch die für das milde französische Klima gezüchtete Kontrolllinie Diva-3 befindet sich darunter. Das Genmaterial der Göttinger Winterackerbohnen-Population scheint hinsichtlich Kältetoleranz recht viel versprechend zu sein, da Nächte bis  $-17,5^{\circ}\text{C}$  von den meisten Linien gut überlebt wurden. Eine Differenzierung hinsichtlich der Überlebensrate und der Überlebensneigung ist deutlich erkennbar und die Prüfglieder unterscheiden sich signi-

fikant voneinander (Tabelle 6). Eine Gruppierung nach Materialgruppe (Tabelle 1) kann nicht beobachtet werden. Die Durchgänge der Frostkammer unterscheiden sich ebenfalls signifikant voneinander. Dies war zu erwarten, da die Temperaturen der Froststufe II nicht identisch war (Tabelle). Ein weiterer Grund für Unterschiede zwischen Durchgängen ist, dass sich die für die einzelnen Durchgänge angezogenen Winterackerbohnen - bedingt durch unvermeidliche Licht- und Klimaunterschiede bei ihrer Aufzucht - sich hinsichtlich ihres Wachses etwas voneinander unterschieden. Dies beeinflusst vermutlich auch die Heritabilität, die trotz genormter Frostkammerversuche nur den Wert  $h^2=0,674$  erreicht. Der Frostkammerindex ( $= 0,5611 \times \text{Überlebensneigung} + 1,1436 \times \text{Wiederaufwuchs}$ ) führte zu einer Heritabilität von  $h^2=0,711$  bei einem Mittelwert des Materials von 46,92 und einer Grenzdifferenz (5%) von 9,42.

### Selektion

Da das Befallsrisiko von Winterformen im Vergleich zu Sommerformen erhöht ist (POETSCH 2006), spielen pilzliche Schaderreger wie *Botrytis* und *Ascochyta* bei Winterackerbohnen eine noch bedeutendere Rolle als bei Sommerackerbohnen. Deshalb wurde für die Selektion der 36 in der Frostkammer untersuchten Winterackerbohnenlinien neben dem Frostkammerindex (bestehend aus Überlebensneigung und Wiederaufwuchs, s.o.) noch zusätzlich die gemeinsame Feldbonitur für die Krankheiten *Ascochyta* und *Botrytis* hinzugezogen (Abbildung 7). Die Krankheitsbonituren der Linien aus den Feldversuchen schwanken zwischen 2,8 und 5,6 Punkten auf einer Boniturskala von null bis neun. Neun ist die höchste Ausprägungsstufe der Krankheiten. Es gab keine Gruppierung der Linien. Die beiden krankheitsanfälligsten Prüfglieder stammen aus der Göttingen Winterackerbohnenpopulation, gefolgt von zwei Linien aus der Kreuzung von Côte d'Or/1  $\times$  BPL4628 (Ab-

**Tabelle 6: Varianzanalyse der Überlebensneigung  $\alpha_{xi}$  über die drei Durchgänge der Frostkammer**

**Table 6: Analysis of variance of disposition to survive  $\alpha_x$  over three loads in the freezing chamber**

Varianzursache	FG	MQ	Varianzkomponente	F	GD5%
Durchgänge	2	3888,4	-	10,36 **	3,97
Wiederholungen I in D.	15	375,4	-	1,23	8,08
Prüfglieder	35	1474,2	55,20	3,07 **	14,57
PD	70	480,6	29,39	1,58 **	19,78
PWD	525	304,2	304,21		

<sup>1</sup> 6 Wiederholungen pro Durchgang entsprechend der beiden Dreisatzsatzgitter pro Durchgang

\*\* Signifikanzniveau 0,01

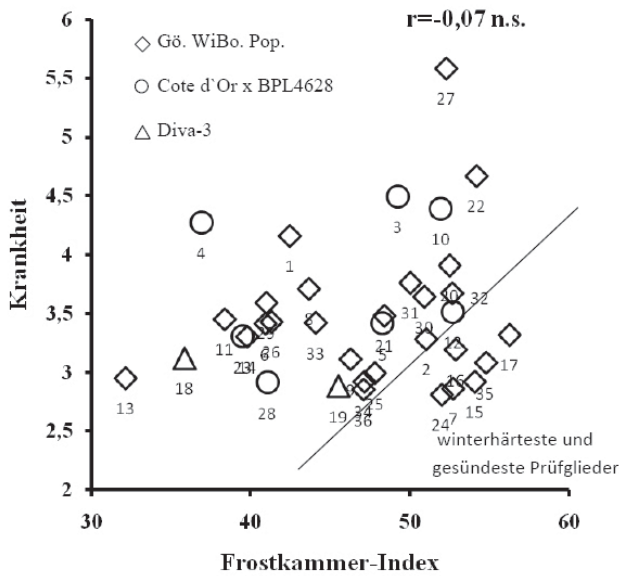


Abbildung 7: Selektion der winterhärtesten und am wenigsten krankheitsanfälligen Winterackerbohnen genotypen aus Frostkammer- und Feldversuchen (2006/07-2008/09) mit Hilfe des Frostkammerindex (GD=9,42) und Krankheitsbonitur (GD=1,02). Prüfgliednummern siehe Tabelle 1

Figure 7: Selection of most frost-hardy faba bean lines with least susceptibility to diseases. Plants were analysed in freezing tests and field trials (2006/07-2008/09). Selection index of freezing chamber: LDS5%=9.42; field-based disease score: GD5%=1.02. Identity of entries cf. Table 1

Abbildung 7). Die Grenzdifferenz über alle im Feld angebaute Prüfglieder beträgt 1,02, der Mittelwert 3,36. Auch der Frostkammerindex zeigt eine signifikante Differenzierung zwischen den Linien. Die frosttolerantesten Genotypen stammen aus der Göttinger Winterackerbohnenpopulation (Prüfglieder 17, 35, 22, 15; Tabelle 1). Die kälteanfällige Linie ist ebenfalls aus der Göttinger Winterackerbohnenpopulation (Prüfglied 13) gefolgt von der Kontrolle Diva-3 und Prüfglied 4 aus der Kreuzung von Côte d'Or/1 x BPL4628. Unter den untersuchten Linien aus der Kreuzung der „exotischen“ Winterackerbohnen (Côte d'Or/1 x BPL4628) konnte keine auffällig gute gefunden werden, die einen sehr guten Frostkammerindex mit einer niedrigen Krankheitsbonitur vereint hätte. Die Linien, die diese Anforderung am besten erfüllen stammen aus der Göttinger Winterackerbohnenpopulation (Abbildung 7).

### Danksagung

Unser Dank geht an die Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e.V. in Gülzow bzw. an das BMELV für die

Finanzierung des Projektes, zu dem diese Versuche gehören. Ebenso möchten wir gegenüber dem Züchterhaus NPZ Lembke für die überaus kollegiale und erfolgreiche Zusammenarbeit und Unterstützung unseren Dank ausdrücken.

### Literatur

ARBAOUI M, BALKO C, LINK W, 2008: Study of faba bean (*Vicia faba* L.) winter hardiness and development of screening methods. *Field Crops Res* 106, 60-67.

BAKER RJ, 1986: Selection indices in plant breeding. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida.

DUC G, PETITJEAN F, 1995: Study on the inheritance of freezing tolerance in *Vicia faba* L. In: 2<sup>nd</sup> European Conference on Grain Legumes, Copenhagen, 130-131.

GHAOUTI L, 2007: Comparison of pure line cultivars with synthetic cultivars in local breeding of faba bean (*Vicia faba* L.) for organic farming. PhD thesis, Georg-August-Universität, Göttingen.

LINK, W., 2009: Züchtungsforschung bei der Ackerbohne: Fakten und Potentiale. *Journal für Kulturpflanzen* 61, 341-347.

LINK W, ARBOUI M, 2006: Neues von der Göttinger Winter-Ackerbohne. Bericht über die 56. Tagung 2005 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 31-38. HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Irnding.

OLSZEWSKI A, HERZOG H, 1994: Frost-Resistenz-Verbreitung bei *Vicia faba* L. *Mitt Ges Pflanzenbauwiss* 7, 411-413.

POETSCH J, 2006: Pflanzenbauliche Untersuchungen zum ökologischen Anbau von Körnerleguminosen an sommertrockenen Standorten Südwestdeutschlands. Dissertation, Universität Hohenheim, Stuttgart.

SASS O, 2009: Marktsituation und züchterische Aktivitäten bei Ackerbohnen und Körnererbsen in der EU. *Journal für Kulturpflanzen* 61, 306-308.

SPECHT M, 2009: Anbau von Körnerleguminosen in Deutschland - Situation, limitierende Faktoren und Chancen. *Journal für Kulturpflanzen* 61, 302-305.

UTZ HF, 1994: PLABCOV (Version 1B(L)), A computer program for statistical covariance analysis of plant breeding experiments. Institute of Plant Breeding, Seed Science, and Population Genetics, University of Hohenheim, Stuttgart.

UTZ HF, 2004: PLABSTAT. Ein Computerprogramm zur statistischen Analyse von pflanzenzüchterischen Experimenten, Vers. 3. Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik, Universität Hohenheim, Stuttgart.

UTZ HF, 2007: PLABSTAT (Version 2N), A computer program for the computation of variances and covariances. Institute of Plant Breeding, Seed Science, and Population Genetics, University of Hohenheim, Stuttgart.

# Identification of boron (B) tolerance genes in barley and wheat

Thorsten Schnurbusch<sup>1,2</sup>, Julie Hayes<sup>1</sup>, Margaret Pallotta<sup>1</sup>, Peter Langridge<sup>1</sup>, Tim Sutton<sup>1</sup>

## Abstract

Boron (B) toxicity is an eminent limitation in regions of small grain cereal production worldwide, including parts of southern Australia. In recent years, much progress has been made by research groups in Australia investigating the physiological and molecular mechanisms involved in B toxicity tolerance in both barley (*Hordeum vulgare* L.) and wheat (*Triticum* L.). In barley, genes have been identified controlling B tolerance at two of the four known B toxicity tolerance loci. Progress has also been made towards the identification of genes involved in B toxicity tolerance in wheat. Here we describe the current status of B toxicity tolerance research in Australia.

The Algerian barley landrace Sahara 3771 proved of being highly tolerant to B and thus, represents one of the most B-tolerant barleys currently known. It carries four quantitative trait loci (QTL) conferring tolerance to toxic B conditions. One gene (*HvBot1*) underlying the tolerance QTL on chromosome 4H of barley has recently been identified and is a putative membrane-bound B transporter with similarity to bicarbonate transporters in animals; it functions as an efflux transporter to move B out of the plant (SUTTON et al. 2007). *Bot1* was the first B tolerance QTL to be identified in plants. In this work, we describe the identification of a second high B tolerance QTL in barley, mapping to the 6H B tolerance locus, *Bot3*. Higher tolerance to B in Sahara 3771 is mediated through lower transcript levels of *Bot3* in root tips of barley plants possibly owing to a repeat insertion into the promoter region approximately 2 kb upstream of the start codon. Moreover, we observed lower shoot B accumulation in a rice (*Oryza sativa* L.) mutant possessing a point mutation in the orthologous rice gene of *Bot3*. Based

upon our results we conclude that under high soil B *Bot3* entails lower shoot B accumulation and thus, effectually aids to higher B tolerance in Sahara 3771.

In bread and durum wheat, tolerance to high B is controlled by a major tolerance locus for reduced shoot B accumulation on the long arm of chromosome 7B (*Bo1*). It co-segregated with the co-dominant sequence tagged site (STS) molecular marker locus *Xaww5L7-7BL* in the Cranbrook×Halberd doubled haploid and Yallaroi×AUS14010 F<sub>2</sub> populations (SCHNURBUSCH et al. 2007, 2008). AWW5L7 proved to be highly predictive for the occurrence of *Bo1* in a set of 94 Australian bread wheat cultivars and breeding lines, indicating that *Bo1*-derived tolerance is prevalent in Australian bread wheat germplasm.

## Keywords

Candidate gene, cloning, functional analysis, mapping, marker, QTL

## References

- SCHNURBUSCH T, COLLINS NC, EASTWOOD RF, SUTTON T, JEFFERIES SP, LANGRIDGE P, 2007: Fine mapping and targeted SNP survey using rice-wheat gene colinearity in the region of the *Bo1* boron toxicity tolerance locus of bread wheat. *Theor Appl Genet* 115, 451-461.
- SCHNURBUSCH T, LANGRIDGE P, SUTTON T, 2008: The *Bo1*-specific PCR marker AWW5L7 is predictive of boron tolerance status in a range of exotic durum and bread wheats. *Genome* 51, 963-971.
- SUTTON T, BAUMANN U, HAYES J, COLLINS NC, SHI BJ, SCHNURBUSCH T, HAY A, MAYO G, PALLOTTA M, TESTER M, LANGRIDGE P, 2007: Boron-toxicity tolerance in barley arising from efflux transporter amplification. *Science* 318, 1446-1449.

<sup>1</sup> Australian Centre for Plant Functional Genomics, School of Agriculture, Food and Wine, University of Adelaide, Waite Campus, Urrbrae, South Australia 5064, Australia

<sup>2</sup> Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Genebank Department, Corrensstr. 3, D-06466 GATERSLEBEN

\* Ansprechpartner: Dr. Thorsten SCHNURBUSCH, thor@ipk-gatersleben.de

# Validation eines neuen Genpoolkonzeptes für die Energiemaiszüchtung Validation of a new gene pool concept for energy maize breeding

Hartwig H. Geiger<sup>1\*</sup>, Henriette Burger<sup>1,2</sup> und Walter Schmidt<sup>2</sup>

## Abstract

The German energy maize acreage increased from 4 000 ha in 2004 to about 375 000 ha in 2009. All energy maize is used for biogas (methane) production. The crop is conserved as whole-plant silage. Maximum methane yields are obtained if the whole-plant moisture content at harvest ranges between 30 and 34%. Up to this developmental stage the still immature ears and the whole biomass (ears plus stover) provide similar amounts of methane per unit dry matter. Therefore, a close correlation exists between methane yield and biomass dry matter yield allowing the breeder to largely neglect genotypic variation in ear proportion and rather focus selection on maximizing biomass production. To this end we created seed and pollen parent gene pools with specific suitability for biogas production by combining the climatic adaptedness of Central European elite lines with the high productivity level of Southern European lines as well as with the cold tolerance of high-elevation Peruvian landraces, and the late flowering of tropical short-day germplasm. First experimental hybrids were tested in a multilocation yield trial in 2007. Various hybrids surpassed actual silage maize hybrids in biomass yield by 15 to 20% while reaching a dry matter content of 30-32% by the end of the season. These highyielding hybrids had tall leafy plants with thick, sturdy stems. They excelled in superior early vigor and remained in the fast growing vegetative phase until the end of August. Results clearly demonstrate that the newly developed gene pools are optimally suited for creating superior energy hybrids.

## Keywords

Biogas, gene pool, hybrid, landrace, methane, *Zea mays*

zeichnet sich seit zwei Jahren eine starke Zunahme der Energiemaisproduktion ab.

Ziel der Energiemaiszüchtung ist die Maximierung des Methanertrages, d.h. der erzeugten Methanmenge je Flächeneinheit. Komponenten des Methanertrages sind der Gesamttrockenmasse (GTM)-Ertrag und die in der Biogasanlage gewonnene Methanmenge je Gewichtseinheit Substrat, kurz die Methanausbeute. Wie AMON et al. (2004) zeigen konnten, ist die Methanausbeute zwischen dem Milch- und Teigreifstadium annähernd konstant und wird in dieser Entwicklungsphase kaum vom Kolbenanteil beeinflusst. Dem entsprechend fanden Oechsner und Mucke (2008) in mehrjährigen und mehrortigen Feldversuchen mit gestaffelten Ernteterminen und Hybriden unterschiedlicher Reifegruppe eine straffe Beziehung zwischen GTM-Ertrag und Methanertrag ( $r^2 = 0,97$ ). Da Lignin und lignifizierte Zellwandbestandteile von den Biogasbakterien nicht abgebaut werden (WEILAND 2001), verringert sich die Methanausbeute ab der Gelbreife deutlich (AMON et al. 2004).

Aus obigen Befunden ergibt sich für den Energiemaiszüchter die Aufgabe, Sorten mit früh einsetzender, starker Massenwüchsigkeit zu entwickeln, die gleichwohl bis zum Vegetationsende sicher die Silierfähigkeit (30-32% Gesamtpflanzen-Trockensubstanz (GTS)-Gehalt) erreichen. Entsprechend dieser Aufgabenstellung begann die KWS SAAT AG bereits 2002 (SCHMIDT 2004), in mehreren Stufen sowohl auf der Saatelter- als auch auf der Pollenel-

**Table 1: Entwicklung der Maisanbaufläche (1000 ha) in Deutschland 2004-2009 unterteilt nach Nutzungsrichtungen (Quellen: Deutsches Maiskomitee 2004-2008, Kleffmann Group 2009; zitiert bei W. SCHMIDT, Vortrag, KWS Einbeck, Sept. 2009)**

**Table 1: Trend of the German maize acreage (1000 ha) during 2004-2009 according to usage (grain, forage, biogas and total) (Sources: German Maize Committee (DMK) 2004-2008, Kleffmann Group 2009; cited by W. SCHMIDT, Presentation at KWS Einbeck, Sept. 2009)**

Jahr	Körner	Silage		Gesamt
		Futter	Biogas	
2004	462	1244	4	1710
2005	443	1190	73	1706
2006	401	1194	152	1747
2007	403	1263	208	1874
2008	520	1277	290	2087
2009	470	1268	375	2113

## Einleitung

Als Energiemais bezeichnen wir einen silierbaren Mais (*Zea mays* L.) mit spezieller Eignung für die Erzeugung von Biogas (Methan, CH<sub>4</sub>). Im Zeitraum 2004 bis 2009 stieg in Deutschland die Energiemaisfläche annähernd linear von 4000 ha auf etwa 375 000 ha (Table 1). Schon für das Anbaujahr 2010 ist zu erwarten, dass die Energiemaisfläche die Körnermaisfläche übertreffen wird. Auch in Österreich

<sup>1</sup> Universität Hohenheim, Fruwirthstraße 25, D-70593 STUTTGART

<sup>2</sup> KWS SAAT AG, Grimsehlstraße 3, D-37555 EINBECK

\* Ansprechpartner: Prof. Dr. Hartwig H. GEIGER, geigerhh@uni-hohenheim.de

Tabelle 2: Ausgangsmaterial für den Aufbau der neuen Energiemais-Genpools

Table 2: Source materials used for gene pool development

Elternerseite	Abkürzung	Erläuterung
Saatelter	D	Mitteleuropäische Dent-Silomaislinien
	SSS	Südeuropäische Dent-Körnermaislinien ('Stiff-Stalk-Synthetik'-Pool)
	Mex	Mexikanische Dentmaisherkünfte
Pollenelter	F	Mitteleuropäische Flint-Silomaislinien
	Lanc	Südeurop. Körnermaislinien ('Lancaster'-Pool)
	Peru	Peruanischer Hochlandmais ( $\geq 3000$ m ü. NN)

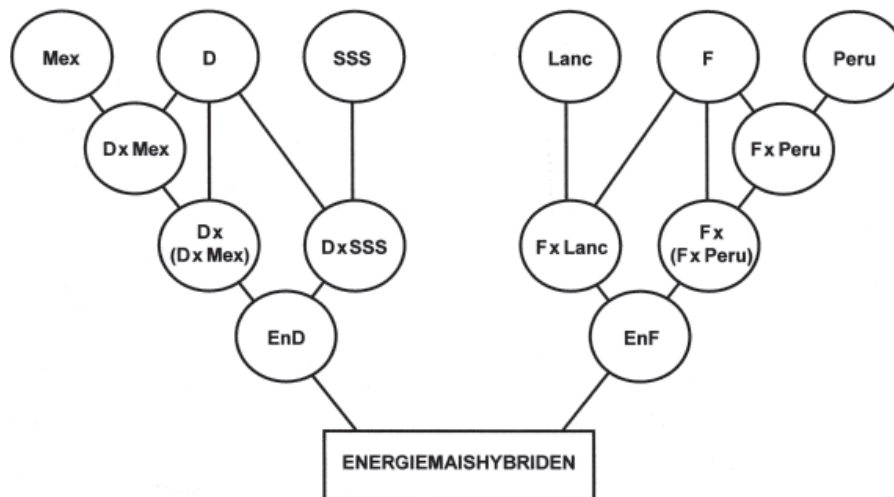


Abbildung 1: Flussdiagramm des Aufbaus der Energiemais-Genpools (Erläuterung der Abkürzungen in Tabelle 2)

Figure 1: Flow diagram illustrating the build-up of gene pools for breeding energy maize (for abbreviations see Table 2)

terseite geeignetes Ausgangsmaterial (Genpools) für die Energiemaiszüchtung zu entwickeln. Aus diesem Material standen 2006 erstmals vorgeprüfte, überwiegend doppelhaploide, Linien zur Verfügung, die 2007 in faktoriellen Kreuzungen auf Kombinationsfähigkeit geprüft wurden. Diese Prüfung stellt die erste Validation des vorstehenden Konzeptes dar. Das dafür verwendete Zuchtmaterial und die Ergebnisse der Leistungsprüfung sollen hier vorgestellt und diskutiert werden.

## Material und Methoden

Das für den Aufbau der Genpools verwendete Ausgangsmaterial gliedert sich auf der Saat- wie auf der Pollenelterseite entsprechend der von ihnen beigesteuerten Werteeigenschaften in jeweils drei Gruppen (Tabelle 2). (i) Anpassung an die mitteleuropäischen Standortbedingungen lieferten aktuelle adaptierte mitteleuropäische Dent- bzw. Flint-Silomaislinien. (ii) Höchste Produktivität trugen südfranzösische und norditalienische Linien des Stiff-Stalk-Synthetic- bzw. des Lancaster-Pools bei. (iii) Blühverzögerung durch Kurztagsgene wurde aus mexikanischen Hybriden und Landrassen der peruanischen Hochlandzone ( $\geq 3000$  m über NN) eingekreuzt, wobei letztere gleichzeitig Kühltoleranz beisteuerten.

Die tropischen Formen wurden wegen mangelnder Standfestigkeit und verschiedener Anpassungsschwächen einmal zum adaptierten Genpool rückgekreuzt, bevor mit der Linienent-

wicklung begonnen wurde. Diese neuen Pools wurden mit den Abkürzungen  $D \times (D \times \text{Mex})$  bzw.  $F \times (F \times \text{Peru})$  bezeichnet. Kreuzungen zwischen südeuropäischen SSS-Linien und mitteleuropäischen Dentlinien sowie zwischen südeuropäischen Lancaster-Linien und mitteleuropäischen Flintlinien ergaben die Mischpools  $D \times \text{SSS}$  bzw.  $F \times \text{Lanc}$ . Aus der Verschmelzung der Genpools  $D \times \text{SSS}$  und  $D \times (D \times \text{Mex})$  entstand schließlich der eigentliche Energiemaispool EnD und aus den Genpools  $F \times \text{Lanc}$  und  $F \times (F \times \text{Peru})$  der Energiemaispool EnF (Abbildung 1).

Für die Herstellung der im vorliegenden Experiment geprüften Kreuzungen wurden auf der Saat- und Pollenelterseite jeweils 4 der obigen Genpools herangezogen, so dass 16 Kreuzungsgruppen entstanden. Aus den einzelnen Genpools kamen 1, 2 oder 3 Linien zum Einsatz (Tabelle 4). Insgesamt ergaben sich so 81 Einfachhybriden. Die Leistungsprüfung wurde 2007 an den Versuchsorten Hohenheim und Kleinohenheim (beide bei Stuttgart), Nördlingen (Bayern) und Wiebrechtshausen (bei Einbeck) angelegt. In Hohenheim und Nördlingen wurden die Versuchsflächen konventionell bewirtschaftet, in Kleinohenheim und Wiebrechtshausen ökologisch. Alle Versuche wurden als Zweisatzgitter mit vierreihigen Parzellen angebaut. Die Reihenlänge betrug je nach Prüfart 4-6 m und die Bestandesdichte 9 Pflanzen  $\text{m}^{-2}$ . Um Konkurrenzeffekte zwischen den Parzellen zu vermeiden, wurden nur die beiden mittleren Reihen einer Parzelle geerntet. Die Witterung war an allen Standorten während der ganzen Vegetationsperiode für das Maiswachstum günstig.

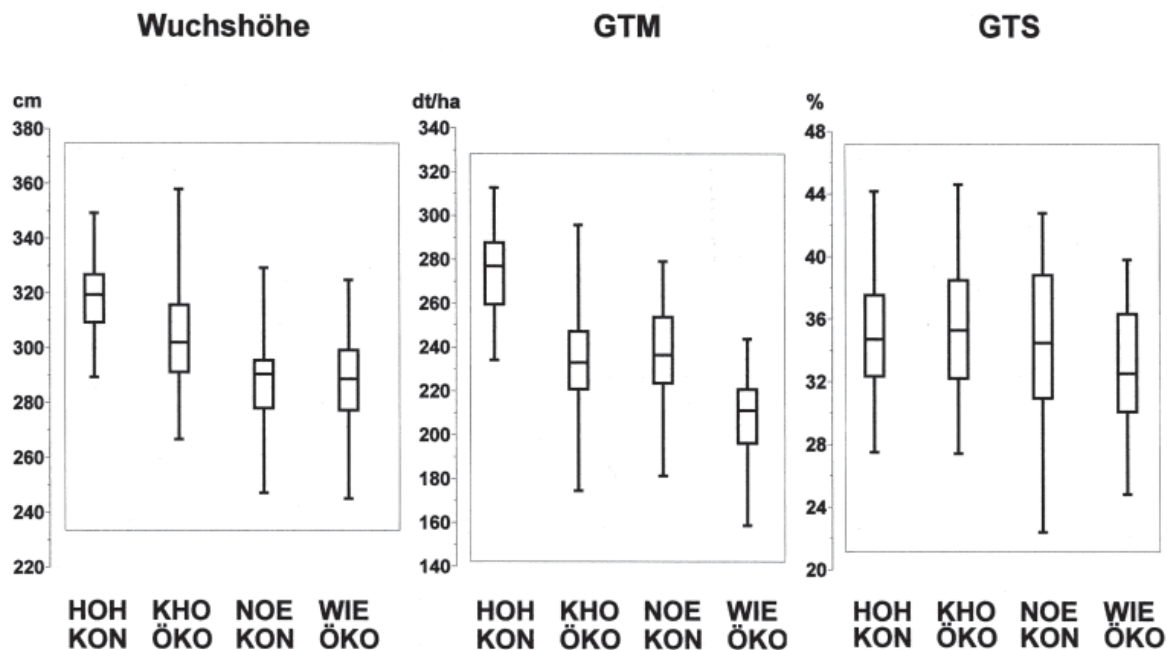


Abbildung 2: Verteilung der Prüfgliedmittelwerte in den einzelnen Testumwelten 2007 für die Merkmale Wuchshöhe, Gesamtpflanzenrockenmasse (GTM) und Gesamtpflanzenrockensubstanzgehalt (GTS); HOH, Hohenheim; KHO, Kleinhohenheim; NOE, Nördlingen; WIE, Wiebrectshausen; KON, konventionell; ÖKO, ökologische Wirtschaftsweise; Boxplots mit Median, 0,25- und 0,75-Quantil sowie Spannweite

Figure 2: Boxplots illustrating the distribution of entry means in four test environments 2007 in Germany for plant height, whole-plant dry matter (GTM) and whole-plant dry matter concentration (GTS); HOH, Hohenheim; KHO, Kleinhohenheim; NOE, Nördlingen; WIE, Wiebrectshausen; KON, conventional farming; ÖKO, organic farming; boxplots with median, 0.25 and 0.75 quantile, and range

Tabelle 3: Ergebnisse der Varianzanalyse für Wuchshöhe (WUH; cm), Gesamtpflanzenrockenmasse (GTM; dt ha<sup>-1</sup>), und Gesamttrockensubstanzgehalt (GTS; %)

Table 3: Results of the analysis of variance for plant height (WUH; cm), whole-plant dry matter (GTM; dt ha<sup>-1</sup>) and whole-plant dry matter content (GTS; %)

Parameter	Varianzursache	WUH	GTM	GTS
F-Wert	Kreuzungsgruppen (K)	7,45**	5,03**	6,18**
	K × Umwelt-Interaktion	1,53*	1,87**	2,38**
Varianzkomponente	Genotypen innerhalb K	86,07**	43,51**	6,57**
Fehler CV (%) <sup>1</sup>	Restvariation zwischen Parzellen	2,98	6,76	4,45

<sup>1</sup> Berechnet aus der zusammengefassten effektiven Fehlervarianz der Einzelversuche (Effective error variance pooled across individual experiments)

\*, \*\* Signifikant für P=0,05 bzw. 0,01

Die Ernte erfolgte Mitte Oktober. Nennenswerte Schäden durch Krankheiten oder Schädlinge waren nicht zu verzeichnen. Einige Hybriden mit Pollenelter aus dem Genpool F×(F×Peru) zeigten Schwächen in der Standfestigkeit.

## Ergebnisse

Die Umweltmittelwerte für den GTM-Ertrag variierten von 210 bis 276 dt ha<sup>-1</sup>, wobei an den ökologisch bewirtschafteten Standorten durchschnittlich 13,6% weniger als an den konventionell bewirtschafteten geerntet wurde. Die höchsten Erträge wurden in Hohenheim erzielt (Abbildung 2). Im Mittelwert und in der Spannweite für GTS-Gehalt unterschieden sich die Umwelten nur unwesentlich. Zwischen den Kreuzungsgruppen bestanden für alle drei Merkmale hoch signifikante genotypische Unterschiede (Tabelle 3). Letzteres gilt auch für die genotypische Varianz innerhalb der Kreuzungsgruppen. Die über die Umwelten zusammen-

gefasste effektive Fehlervarianz der Gitteranlagen lieferte Variationskoeffizienten zwischen 4,4% für Wuchshöhe und 9,6% für GTM-Ertrag.

Den geringsten GTM-Ertrag (226 dt ha<sup>-1</sup>) und den höchsten GTS-Gehalt (38,9%) wies die Vergleichsgruppe der (Dent×Flint)-Silomaishybriden auf, während die Gruppen SSS×[F×(F×Peru)] und [D×(D×Mex)]×(F×Lanc) GTM-Erträge von 259 dt ha<sup>-1</sup> bei GTS-Gehalten von 32,4 bzw. 30,1% erreichten (Tabelle 4). Im Durchschnitt über alle Pollenelterpools wiesen die Kreuzungen mit dem SSS-Saatelterpool die günstigsten Ertrag-Reife-Kombinationen auf, und im Durchschnitt über alle Saatelterpools die Kreuzungen mit dem (F×Lanc)- und dem [F×(F×Peru)]-Pollenelterpool.

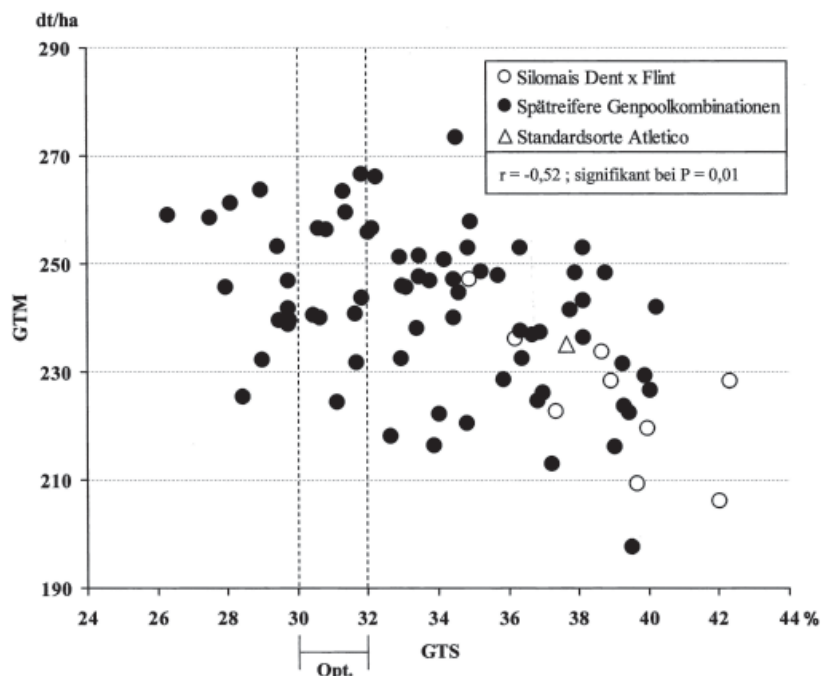
Zwischen dem GTM-Ertrag und dem GTS-Gehalt bestand eine schwach negative phänotypische Korrelation. Dementsprechend wurde in jeder Reifegruppe eine große Spannweite der GTM-Erträge beobachtet (Abbildung 3). So



**Tabelle 4: Mittelwerte der 16 Kreuzungsgruppen für Gesamtpflanzentrockenmasse (GTM) und Gesamtpflanzentrockensubstanzgehalt (GTS); 4 Umwelten 2007 (n = Anzahl Linien je Genpool)**

**Table 4: Means of the 16 crossing groups for whole-plant dry matter yield (GTM) and whole-plant dry matter content (GTS); 4 environments 2007 (n = number of lines per gene pool)**

Saateltergenpool		Polleneltergenpool			
		Flint (F) n=3	F×Lanc n=2	Lanc n=2	F×(F×Peru) n=2
		GTM (dt ha <sup>-1</sup> )			
Dent (D)	n=3	226	231	216	251
D×SSS	n=3	240	243	232	251
SSS	n=2	243	255	235	259
D×(D×Mex)	n=1	242	259	243	259
		GTS (%)			
Dent (D)	n=3	38,9	37,5	36,4	34,4
D×SSS	n=3	36,1	32,6	32,0	31,0
SSS	n=2	37,5	33,9	32,8	32,4
D×(D×Mex)	n=1	32,6	30,1	29,3	26,9



**Abbildung 3: Beziehung zwischen Gesamtpflanzentrockenmasse (GTM) und Gesamtpflanzentrockensubstanzgehalt (GTS) der 81 Testhybriden (Opt. = optimaler Reifegradbereich für Energiemais)**

**Figure 3: Relationship between whole-plant dry matter (GTM) and whole-plant dry matter content (GTS) of 81 test hybrids (Opt. = optimal maturity range for energy maize); empty circles = silage maize Dent×Flint hybrids; filled circles = late maturing gene pool combinations; triangle = check hybrid variety Atletico**

lag im optimalen GTS-Bereich von 30-34% der höchste Ertrag bei 267 dt ha<sup>-1</sup> und der niedrigste bei 216 dt ha<sup>-1</sup>. Die vier ertragreichsten Prüfglieder mit einem GTS-Gehalt über 30% rangierten im Ertrag zwischen 273 und 263 dt ha<sup>-1</sup> (Tabelle 5). Jede dieser Hybriden geht auf Einkreuzungen aus südeuropäischem und/oder mexikanischem bzw. peruanischem Material zurück.

## Diskussion und Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass nach dem vorliegenden Ansatz eindrucksvolle Leistungen in der Energiemaiszüchtung erreichbar sind. Dabei ist zu beachten, dass in diesem Experiment das Potential des entwickelten

Materials noch nicht voll ausgeschöpft wurde, da zunächst nur Komponenten der auf der Saat- und Pollenelterseite inzwischen aufgebauten finalen Genpools zum Einsatz kamen.

Die kurze Zeitspanne vom Beginn des Materialaufbaus im Jahre 2002 bis zur Herstellung der hier getesteten Hybriden lässt erkennen, mit welcher Geschwindigkeit und Effektivität die moderne Maiszüchtung arbeitet. Neben dem Einsatz von Winterzuchtgärten trägt dazu in den letzten Jahren ganz wesentlich die konsequente Anwendung der Doppelhaploidentechnik bei. Sie hat sich gerade bei der Erschließung nicht-adaptierter genetischer Ressourcen als außerordentlich hilfreich erwiesen (WILDE et al. 2009).

**Tabelle 5: Mittelwerte der sieben ertragreichsten Hybriden mit GTS  $\geq$  30,0% (4 Umwelten 2007) im Vergleich zu einer spätreifen Silomaishybridensorte****Table 5: Means of the seven highest yielding hybrids with GTS  $\geq$  30.0% (4 environments 2007) in comparison with a late maturing silage maize hybrid variety**

Hybrid	GTM <sup>1</sup>		GTS (%)	Genpool-Kombination
	dt ha <sup>-1</sup>	% DF		
1	273,5	121	34,5	SSS×[F×(F×Peru)]
2	266,6	118	31,9	(D×SSS)×[F×(F×Peru)]
3	266,2	118	32,3	D×[F×(F×Peru)]
4	263,5	117	31,3	D×[F×(F×Peru)]
5	259,5	115	31,4	SSS×(F×Lanc)
6	257,8	114	34,9	SSS×F
7	256,6	114	32,2	[D×(D×Mex)]×F
Atletico	235,1	104	37,2	

<sup>1</sup> GTM, Gesamtpflanzentrockenmasse (whole-plant dry matter); GTS, Gesamtpflanzentrockensubstanzgehalt (whole-plant dry matter content); % DF, GTM relativ zum Mittelwert der (D×F)-Gruppe (GTM relative to that of the (D×F) group)

Die für einen maximalen Biogasertrag erforderliche späte Blüte wurde erwartungsgemäß sowohl durch Einkreuzen südeuropäischer Elitelinien als auch durch Introgression von Kurztagsgenen aus tropischen Herkünften erreicht. Bei der Evaluierung der Introgressionslinien bestätigten sich Befunde von CHARDON et al. (2004), wonach der Blühtermin solcher Formen im gemäßigten Klima polygenisch vererbt wird. Die peruanischen Hochlandrassen trugen zudem zu einer erhöhten Kühletoleranz bei, während die mexikanischen und südeuropäischen Ausgangsformen zunächst zu einer Schwächung der Kühletoleranz führten. Durch wiederholte Rekombination und intensive Selektion auf Jugendwüchsigkeit konnte dieser Nachteil aber auf der Saatterseite weitgehend und auf der Pollenelaterseite vollständig aufgehoben werden. In den anschließend durch Verschmelzen der hier getesteten Materialgruppen geschaffenen Saat- bzw. Pollenelaterpools (*Abbildung 1*) stehen jetzt mehrere aussichtsreiche Linien zur Verfügung, deren Hybriden in diesem Jahr einer ökologisch weit gestreuten Energiemaissprüfung unterzogen werden.

Außer der späteren Blüte und der verbesserten Kühletoleranz könnten auch erhöhte Heterosiseffekte zur Leistungsüberlegenheit der Hybriden mit peruanischem Genanteil beigetragen haben. Sehr wahrscheinlich haben die in den Hochanden kultivierten Landsorten bisher noch keine wesentliche Verwendung in der europäischen oder nordamerikanischen Maiszüchtung gefunden, so dass sie zu diesem Material eine weit überdurchschnittliche genetische Distanz besitzen. Die daraus resultierende Heterozygotieerhöhung in den Hybriden könnte durchaus einen erhöhten Heterosiszuwachs bewirkt haben.

Angesichts des ungebrochenen Trends in der Erweiterung bestehender und Errichtung neuer Biogasanlagen ist davon auszugehen, dass der Energiemaissanbau in Deutschland schon in Kürze die zweite Stelle nach dem Silomaissanbau einnehmen wird. Es erscheint daher sinnvoll und notwendig, künftig in der Maiszüchtung nicht nur Körner- und

Silomaishybriden, sondern auch auf die Biogaserzeugung zielende Energiemaishybriden zu entwickeln. Die im vorliegenden Experiment erhaltenen hohen GTM-Erträge zeigen, dass die für diese dritte Nutzungsrichtung geschaffenen neuen Genpools voll den in sie gesetzten Erwartungen entsprechen.

## Danksagung

Für die sorgfältige und engagierte Versuchsbetreuung an den vier Prüferten danken die Autoren vielmals Melanie Braun, Oliver Hübner, Jochen Jesse, Silvia Koch, Hartmut Meyer und Patric Schrader.

## Literatur

- AMON TH, KRYVORUCHKO V, AMON B, ZOLLITSCH W, MAYER K, BUGA S, AMID A, 2004: Biogaserzeugung aus Mais - Einfluss der Inhaltsstoffe auf das spezifische Methanbildungsvermögen von früh- bis spätreifen Maissorten. Bericht 54. Tagung 2003 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 59-68. BAL Gumpenstein, Irnding.
- CHARDON F, VIRLON B, Moreau L, FALQUE M, DECOUSSET L, MURIGNEUX A, CHARCOSSET A, 2004: Genetic architecture of flowering time in maize inferred from QTL meta-analysis and synteny conservation with the rice genome. *Genetics* 162, 2169-218.
- OECHSNER H, MUKENGELE MM, 2008: Erschließung des biosynthetischen Potenzials einheimischer Nutzpflanzen als nachwachsende Rohstoffe zu Erzeugung erneuerbarer Energie. BMVEL-FNRProjekt 22000403, Endbericht.
- SCHMIDT W, 2004: Hybridmaiszüchtung bei der KWS SAAT AG. Bericht 54. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 1-6. BAL Gumpenstein, Irnding.
- WEILAND P, 2001: Grundlagen der Methangärung - Biologie und Substrate. VDI-Bericht 1620, 19-32.
- WILDE K, BURGER H, PRIGGE V, PRESTERL T, SCHMIDT W, OUNOVÁ M, GEIGER HH, 2009: Testcross performance of doubled-haploid lines developed from European flint maize landraces. *Plant Breeding*, in press. DOI:10.1111/j.1439-0523.2009.01677.x.

## Sortenentwicklung für den ökologischen Landbau bei Mais Maize hybrid development for organic agriculture

Susanne Kohls<sup>1</sup>, Henriette Burger<sup>2</sup>, Walter Schmidt<sup>2</sup> und Hartwig H. Geiger<sup>1</sup>

### Abstract

Maize cultivation has gained importance. In recent years, the acreage increased especially on lower-yielding sites and even in organic agriculture due to its use as a fuel and fodder crop. On these sites, a frequent common limiting factor is nitrogen supply. Therefore, there is a need for new environmentally stable maize varieties which are high-yielding not only under conventional conditions (CON), but equally under nitrogen deficiency (LN) and in organic agriculture (ORG). The aim of this study is to investigate if such properties can be combined in one genotype. We conducted comparative field trials with modern maize breeding germplasm under ORG, CON and LN conditions in order to estimate yield correlations. Phenotypic correlations between all three farming systems were moderate. However, a small top-ranking fraction of hybrids showed high performance under ORG, LN and CON. The identification of these genotypes is only reliable if test sites of all conditions are included in the selection process.

### Keywords

organic agriculture, hybrid breeding, low input, nitrogen efficiency, *Zea mays*

### Einleitung

In Deutschland stieg die Maisanbaufläche seit dem Jahr 2000 stark an (DEUTSCHES MAISKOMITEE 2009). Dabei dehnt sich die Fläche häufig auf Standorte mit geringerem Ertragspotential bzw. auf ehemals klassische Grünlandstandorte aus; eine Entwicklung, die TAUBE und HERRMANN (2009) mit dem Ausdruck „Mais statt Gras“ beschrieben haben. Aufgrund seiner Bedeutung als Futterpflanze stieg der Maisanbau auch im ökologischen Landbau, obwohl der Anbau dort noch immer mit einem höheren Anbaurisiko behaftet ist. Die starke Ausdehnung des Maisanbaus zieht einige negative Umwelteffekte nach sich, die u.a. mit einem erhöhten Nitratauswaschungsrisiko zusammenhängen. In Wasserschutzgebieten wird der Maisanbau deshalb bereits mit verringerter Stickstoff (N)-zufuhr praktiziert, die durch umweltpolitische Vorgaben zur Einhaltung der EU-Wasserrahmenrichtlinie limitiert ist. In diesem Zusammenhang können N-effiziente Sorten einen Beitrag zu einer umweltgerechteren Maisproduktion leisten.

In der Maiszüchtung gibt es bereits Erfahrungen zur Steigerung der N-Effizienz. In verschiedenen Forschungsarbeiten wurde nachgewiesen, dass unter N-Mangel selektierte Hybriden bei N-Limitierung höhere Erträge liefern als Hybriden, die unter ausreichend versorgten Bedingungen entwickelt wurden (THIEMT 2002). Außerdem zeichneten sich die unter N-Mangel selektierten Hybriden durch eine erhöhte phänotypische Stabilität aus (LANDBECK 1995). Diese Ergebnisse könnten Impulse für die Züchtung von Hybriden liefern, die gut an ökologische Bedingungen angepasst sind. Temporärer N-Mangel ist eine häufige Stresskomponente im ökologischen Maisanbau: Da keine mineralischen Düngemittel eingesetzt werden dürfen, kann es zeitweise zu Mangelsymptomen kommen, wenn z.B. in kühlen Frühjahren die Mineralisierung nur schleppend in Gang kommt. Insgesamt sind die Bedingungen im ökologischen variabler als im konventionellen Landbau, so dass der phänotypischen Stabilität der Sorten eine höhere Bedeutung zukommt. Es ist daher Ziel, Hybriden zu entwickeln, die sich auch auf Standorten mit geringerem Ertragspotential bzw. bei Anbau mit verminderten Inputleistungen durch geringe Ertragsabfälle sowie hohe Ertragsstabilität auszeichnen.

In dieser Studie sollen Hinweise darauf gegeben werden, ob die genetischen Eigenschaften für eine breite Anpassung an ökologische, N-Mangel und konventionelle Bedingungen in einem Genotyp vereinbar sind. Dazu wurden Korrelationsbeziehungen zwischen allen drei Anbaubedingungen berechnet.

### Material und Methoden

Im Jahr 2006 wurden 43 Experimentalhybriden geprüft, die aus aktuellem Körnermaiszuchtmaterial der KWS Saat AG entwickelt wurden. Die Versuchsorte waren Bernburg in Sachsen-Anhalt, Grucking in Bayern und Hohenheim in Baden-Württemberg. Aufgrund extremer Trockenheit in Bernburg musste dieser Standort aus der Analyse ausgeschlossen werden. In 7×7 Zweisatzgittern wurden alle Genotypen unter ökologischen (ÖKO), N-Mangel (LN) und konventionellen (KON) Bedingungen auf ihren Kornertrag geprüft. Die LN Versuchsfelder unterschieden sich nur durch eine langjährig fehlende N-Düngung von den KON Flächen, die mit der ortsüblichen Düngermenge und -form versorgt wurden. Die ÖKO Versuchsfelder waren in die Fruchtfolge kontrollierter ökologischer Betriebe eingegliedert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Paket AS-REML. Zur Berechnung der phänotypischen Korrelations-

<sup>1</sup> Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik, Universität Hohenheim, Fruwirthstraße 21, D-70599 STUTTGART

<sup>2</sup> KWS Saat AG, Grimsehlstraße 31, D-37555 EINBECK

\* Ansprechpartner: Susanne KOHLS, susanne.kohls@ipw.agr.ethz.ch

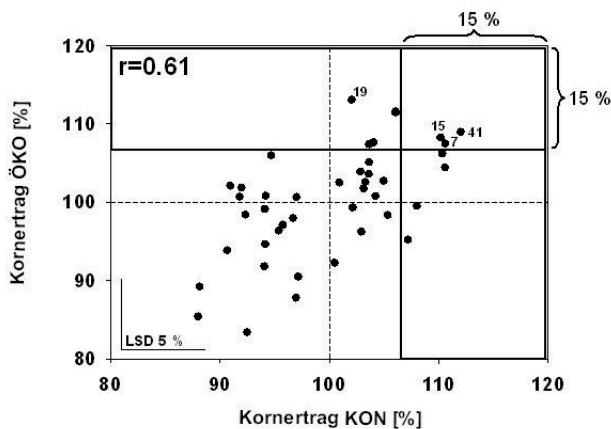


Abbildung 1: Beziehung zwischen Kornertrag unter konventionellen (KON) und ökologischen (ÖKO) Anbaubedingungen (BLUP Schätzwerte über 2 Orte für 43 Hybriden; Jahr 2006; r, Korrelationskoeffizient; 7, 15, 19 und 41, 15% besten Prüfgliednummern; LSD, least significant difference)

Figure 1: Relationship between grain yield under conventional (KON) and organic (ÖKO) farming conditions (BLUP values across two locations 2006 in 2006; r, coefficient of correlation; 7, 15, 19 and 41, 15% best genotypes; LSD, least significant difference)

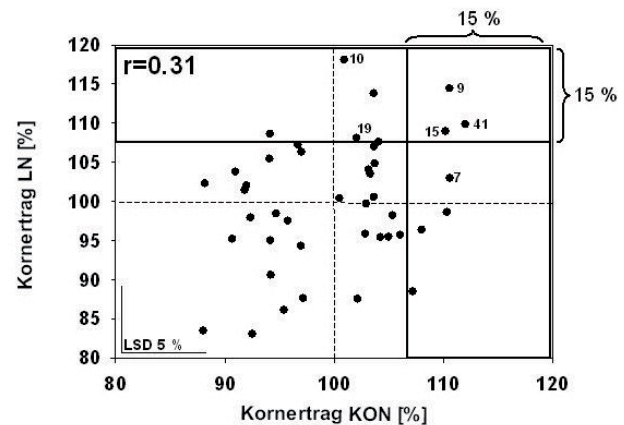


Abbildung 2: Beziehung zwischen Kornertrag unter konventionellen (KON) und Stickstoffmangel (LN) Anbaubedingungen (BLUP Schätzwerte über 2 Orte für 43 Hybriden; Jahr 2006; r, Korrelationskoeffizient; 7, 9, 10, 15, 19 und 41, 15% besten Prüfgliednummern; LSD, least significant difference)

Figure 2: Relationship between grain yield under conventional (KON) and N deficient (LN) farming conditions (BLUP values across two locations 2006 in 2006; r, coefficient of correlation; 7, 9, 10, 15, 19 and 41, 15% best genotypes; LSD, least significant difference)

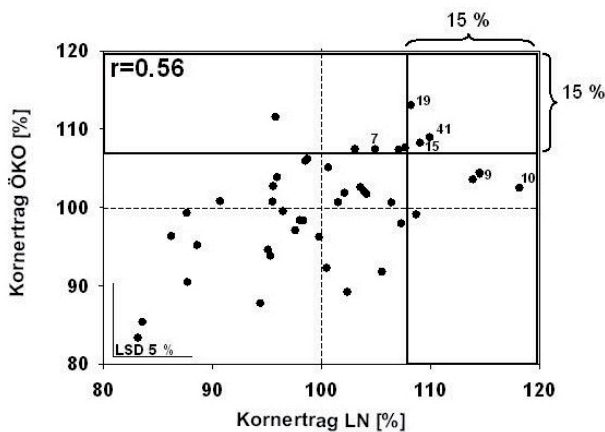


Abbildung 3: Beziehung zwischen dem Kornertrag unter Stickstoffmangel (LN) und ökologischen (ÖKO) Anbaubedingungen (ORG) (BLUP Schätzwerte über 2 Orte für 43 Hybriden; Jahr 2006; r, Korrelationskoeffizient; 7, 9, 10, 15, 19 und 41, 15% besten Prüfgliednummern; LSD, least significant difference)

Figure 3: Relationship between grain yield under N-deficient (LN) and organic (ÖKO) farming conditions (BLUP values across two locations 2006 in 2006; r, coefficient of correlation; 7, 9, 10, 15, 19 and 41, 15% best genotypes; LSD, least significant difference)

koeffizienten wurden die BLUP Schätzwerte für Kornertrag verwendet, die von der zusammenfassenden Varianzanalyse über Genotypen und Orte ermittelt wurden.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Kornerträge waren im Mittel über die Standorte unter KON Bedingungen 23% höher als unter ÖKO (ÖKO: 98 dt ha<sup>-1</sup>; KON: 120 dt ha<sup>-1</sup>). Unter LN Bedingungen (67 dt ha<sup>-1</sup>) war der Ertrag um 31% niedriger als unter ÖKO.

Die Ertragskorrelationen zwischen allen drei Anbaubedingungen lagen im mittleren Bereich: KON vs. ÖKO 0,61,

KON vs. LN 0,3 und LN vs. ÖKO 0,56 (Abbildungen 1-3). Daraus folgt, dass unter den jeweiligen Standortbedingungen eine unterschiedliche Rangreihenfolge der Genotypen vorliegt. Korrelationskoeffizienten ähnlicher Größenordnung wurden auch von BURGER et al. (2008) gefunden. Bei Selektion der 15% besten Genotypen jeder Anbaubedingung zeigte sich, dass diese in den meisten Fällen nur unter einer oder zwei der drei Anbaubedingungen einen Platz in der Spitzengruppe erreichen. Die beste Hybride unter ÖKO rangierte z.B. unter KON nur im mittleren Bereich (Abbildung 1), erreichte aber auch bei LN einen Ertrag unter den 15% Besten (Abbildung 2). Der beste Genotyp unter LN war nur unter dieser Bedingung in der Spitzengruppe.

Dessen ungeachtet gibt es allerdings unter vorliegenden Experimentalhybriden drei Genotypen, die unter allen drei Bedingungen unter den besten 15% rangieren. Um solche ertragsstabilen Genotypen zuverlässig zu selektieren, ist es allerdings notwendig, Leistungsprüfungen unter allen drei Anbaubedingungen anzulegen.

## Literatur

- BURGER H, SCHLOEN M, SCHMIDT W, GEIGER HH, 2008: Quantitative genetic studies on breeding maize for adaptation to organic farming. *Euphytica* 163, 501-510.
- DEUTSCHES MAISKOMITEE e.V. (2009) Flächenerträge von Körnermais und Körnermais in Deutschland [Available online: <http://www.maiskomitee.de/web/intranetHomepages.aspx?hp=CE6D6828-297E-6C8B-0132-878C79CE1C3D>; accessed 28 Dec 2009].
- LANDBECK MV, 1995: Untersuchungen zur genetischen Verbesserung der Anbaueignung von Körnermais unter Produktionsbedingungen mit verringerter Stickstoffversorgung. Dissertation, Universität Hohenheim, Stuttgart.
- TAUBE F, HERRMANN A, 2009: Relative Vorzüglichkeit von Mais und Gras unter Berücksichtigung von Klimawandel. In: Schwarz FJ, Meyer U (eds.), Optimierung des Futterwertes von Mais und Maisprodukten. *Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research* 331, 115-126.
- THIEMT EM, 2002: Untersuchungen zur Ertragssicherheit bei Mais. Dissertation, Universität Hohenheim, Stuttgart

## Importance of appropriate selection environments for breeding maize adapted to organic farming systems

Monika M. Messmer<sup>1</sup>, Henriette Burger<sup>2</sup>, Walter Schmidt<sup>2</sup> and Hartwig H. Geiger<sup>3</sup>

### Abstract

Organic farming systems, characterized by special attention to soil fertility, recycling techniques and low external inputs, gained increased significance in recent years. As a consequence, there is a growing demand for varieties adapted to organic and/or low input farming. The objectives of the present study were to (i) compare the testcross performance of segregating maize (*Zea mays*) populations under established organic (OF) and conventional farming (CF) systems, (ii) determine quantitative genetic parameters decisive for the selection response under OF vs CF conditions, and (iii) draw conclusions for breeding new varieties optimally adapted to OF. Testcross performance of four different material groups of preselected lines (90 lines per group) derived from early European breeding material was assessed under OF and CF in three different geographic regions in Germany in 2008. Grain yields under OF were 3 to 18% lower than under CF in the individual experiments depending on the test region and, to a lesser extent, on the genetic material. On average, grain dry matter yield under OF was 1077 g m<sup>-2</sup> compared to 1186 g m<sup>-2</sup> under CF. Phenotypic correlations between OF and CF were small or moderate for grain yield in each of the four material groups (0.31 to 0.43), while strong and highly significant correlations were found for dry matter content (0.89 to 0.93). Genotypes with top grain yields under OF often did not show this superiority under CF and vice versa. Despite considerable heterogeneity of the OF test sites, the heritability for grain yield was in the same order of magnitude under OF and CF. It is concluded that test sites managed by OF are indispensable for making maximum progress in developing maize varieties for these conditions.

### Keywords

Genotype by farming system interaction, indirect selection, organic farming, testcross performance, *Zea mays*

### Introduction

Organic farming (OF) systems, characterized by special attention to soil fertility, recycling techniques and low external inputs, gained increased significance in recent years. As a consequence, there is a growing demand for

varieties adapted to organic and/or low input farming. In several studies modern varieties as well as landraces have been tested for their suitability for organic farming, whereas special breeding programs aiming at genotypes optimized for this farming system are scarce. Comparing the testcross performance of unselected recombinant inbred lines derived from the widely used US hybrid B73×Mo17 under conventional (CF) and organic farming systems, LORENZANA and BERNARDO (2008) concluded that high yielding maize hybrids for OF can be developed by screening under CF. In contrast, BURGER et al. (2008) found moderate phenotypic correlation between OF and CF in unselected breeding material indicating strong genotype by farming system interactions. Apparently, specific yield associated characteristics are necessary to reach maximum performance under OF and CF, respectively. Such traits include early vigour, competitiveness to weeds, and high nitrogen use efficiency under OF on the one hand, and resistance to green snapping and early root lodging under CF on the other. Thus, selection under OF conditions might be needed to fully exploit the genetic potential of maize for this management system. This is in line with previous studies demonstrating that breeding maize for improved nitrogen use efficiency was more efficient under low nitrogen levels compared to indirect selection under high nitrogen conditions (PRESTERL et al. 2003). But organic farming conditions are very difficult to characterize since they strongly depend on factors like crop rotation, soil fertility, organic fertilizer input, weed, pest and disease pressure, making it challenging to choose a representative selection environment. The objectives of the present study were to (i) compare the testcross performance of segregating maize populations under established organic and conventional farming (CF) systems, (ii) determine quantitative genetic parameters decisive for the selection response under OF vs CF conditions, and (iii) draw conclusions for breeding new varieties optimally adapted to OF systems.

### Materials and Methods

Testcross performance of four different material groups of preselected lines (90 lines per group) derived from early European breeding material of KWS SAAT AG was assessed under OF and CF in three different geographic regions in Germany in 2008. Material groups '151' and '152' comprised flint lines crossed with a dent tester (Tdent),

<sup>1</sup> Research Institute for Organic Agriculture (FiBL), CH-5070 FRICK

<sup>2</sup> KWS SAAT AG, D-37555 EINBECK

<sup>3</sup> University of Hohenheim (350), D-70593 STUTTGART

\* Ansprechpartner: Dr. Monika M. MESSMER, monika.messmer@fibl.org

while material groups '153' and '154' comprised dent lines crossed with a flint tester (Tflint). The lines were derived from various F1 crosses of elite breeding material by *in vivo* haploid induction as described by RÖBER *et al.* (2005) and preselected for their line per se performance for vigour, flowering date, pollen production, lodging resistance, fertility, kernel quality, and general field appearance. Each material group was tested together with a set of 10 standard hybrids in a lattice design (10×10) with two replications at three locations, i.e. Einbeck (EIN) in Lower Saxony, Stuttgart-Hohenheim (HOH) in Baden-Württemberg, and Kaufering (KAUF) in Bavaria. At each location one experiment per material group (with 200 entries) was set up under CF and another experiment under OF with a distance of 2 to 13 km between the test sites, resulting in totally 24 single trials. For each entry, grain yield at harvest, dry matter content (DMC) and dry matter grain yield (DMY) was determined as well as lodging at harvest time.

## Results

Grain yields under OF were 3 to 18% lower than under CF in the individual experiments depending on the test region and, to a lesser extent, on the genetic material (*Table 1*). In general, grain yield and dry matter content at harvest was lower under OF than under CF, resulting in an average DMY of 1077 g m<sup>-2</sup> under OF compared to 1186 g m<sup>-2</sup> under CF. The phenotypic variation for DMY among the 90 testcross lines was great in all material groups and farming systems, with a difference from 750 up to 1050 g m<sup>-2</sup> between highest and lowest yielding genotypes. Phenotypic correlations between OF and CF were small or moderate for DMY within the four material groups (0.31 to 0.43), while strong and highly significant correlations were found for

DMC (0.89 to 0.93). Phenotypic correlations between the different locations within farming systems ranged from 0.28 to 0.67 for DMY under CF and from 0.14 to 0.58 for DMY under OF, reflecting the greater environmental diversity expected in OF. ANOVA across locations revealed high heritability coefficients for DMC and moderate to high values for DMY.

In order to exemplify the effectiveness of selection under CF and OF for OF we selected in each material group the highest yielding 9 lines based on the entry mean DMY across the two locations EIN and KAUF under CF and OF, respectively, and compared their performance with that obtained at the third location (HOH) under OF (*Table 2*). In addition, we estimated the phenotypic correlation between the average DMY in Einbeck and Kaufering under CF and OF, respectively, with the testcross performance in Hohenheim under OF for all 90 lines. Results demonstrate that OF-adapted genotypes can be more reliably selected under OF than under CF.

## Discussion

WOLFE *et al.* (2008) distinguished between three origins of varieties suitable for organic agriculture: (1) varieties derived from breeding programmes for conventional agriculture (BFCA) showing acceptable performance under organic conditions; (2) varieties derived from specific breeding programmes for organic agriculture (BFOA) but for economic reasons, only advanced generations are tested under OF; and (3) varieties derived from 'organic plant breeding' (OPB), which means that all breeding steps are executed under OF using selection and propagation techniques that comply with OF principles. While indirect selection under CF is quite effective for traits with high heritability, like

**Table 1: Mean testcross performance of the four material groups (averaged across 90 lines excluding standards) tested at three locations (EIN, HOH, KAUF) for dry matter grain yield (DMY) and dry matter content (DMC), percentage of performance under OF in relation to CF (OF-CF) as well as phenotypic correlation between CF and OF ( $r_{phen}$ ) for these traits**

Material group/ Location	DMY CF g m <sup>-2</sup>	DMY OF g m <sup>-2</sup>	DMC CF %	DMC OF %	DMY OF/CF %	DMC OF/CF %	DMY $r_{phen}$ (CF-OF)	DMC $r_{phen}$ (CF-OF)
151 Flint lines × Tdent								
EIN	1209	1148	71.9	68.4	94.9	95.0	0.14	0.80
HOH	1351	1266	70.8	68.2	93.7	96.4	0.31	0.90
KAUF	1005	933	68.3	66.1	92.9	96.7	0.37	0.88
mean	1188	1116	70.4	67.6	93.9	96.0	0.36	0.92
152 Flint lines × Tdent								
EIN	1253	1155	72.3	68.0	92.2	94.0	0.31	0.82
HOH	1282	1147	71.0	67.4	89.5	95.0	-0.04	0.77
KAUF	1020	883	67.7	65.5	86.6	96.7	0.45	0.85
mean	1185	1062	70.3	67.0	89.6	95.2	0.39	0.89
153 Dent lines × Tflint								
EIN	1169	1133	71.6	68.0	97.0	94.9	0.14	0.84
HOH	1295	1180	70.1	67.5	91.1	96.3	0.30	0.86
KAUF	1047	860	68.3	67.2	82.1	98.4	0.51	0.89
mean	1170	1057	70.0	67.6	90.4	96.5	0.43	0.93
154 Dent lines × Tflint								
EIN	1209	1140	72.2	68.7	94.3	95.2	0.36	0.76
HOH	1349	1213	71.0	68.2	89.9	96.0	0.18	0.87
KAUF	1042	867	69.4	67.8	83.2	97.7	0.23	0.90
mean	1200	1073	70.9	68.2	89.5	96.3	0.31	0.91
Across groups	1186	1077	70.4	67.6	90.8	96.0	0.36	0.89

**Table 2: Phenotypic correlation ( $r_{phen}$ ) for testcross grain yield (DMY) between Hohenheim under OF (HOHOF) and the average DMY at the other two locations under CF and OF, respectively, as well as the DMY realized in HOHOF for the highest yielding 9 genotypes across EIN and KAUF locations under the different farming systems**

Material group	$r_{phen}$		Average DMY at HOH <sub>OF</sub> of best 9 genotypes selected at EIN+KAUF	
	HOH <sub>OF</sub> -(EIN+KAUF) <sub>CF</sub>	HOH <sub>OF</sub> -(EIN+KAUF) <sub>OF</sub>	CF (g m <sup>-2</sup> )	OF (g m <sup>-2</sup> )
151	0.26	0.39	1313	1331
152	0.16	0.33	1186	1194
153	0.29	0.59	1195	1265
154	0.29	0.52	1307	1305

earliness, plant height, and thousand kernel mass, this is not always the case for more complex traits characterized by high genotype by environment interaction. For breeding success, it is essential that the selected genotypes show superiority in the target environment, i.e. under organic farming. Especially for complex traits, like grain yield, it is therefore important to determine the ratio of expected indirect versus direct selection gain in order to optimize the breeding strategy. This ratio depends on the heritability coefficients determined under OF and CF and genotypic correlations between the two farming systems.

In contrast to the study of LORENZANA and BERNARDO (2008) comparing the testcross grain yield of 117 unselected inbred lines derived from one US single cross hybrid under CF and OF, our data which are based on four different material groups representing a wide range of the early maturing European germplasm clearly demonstrated the advantage of direct selection under OF for improved grain yield. In view of the fact, that in all three studies the average DMY was very high (>1000 g m<sup>-2</sup>) for both farming systems with a yield reduction of only 6 to 15% under OF compared to CF, maize production under OF in practice might frequently be exposed to less favourable growing conditions such as limited nitrogen supply and/or release from organic fertilizer, weed interference, and seedling diseases, causing yield reduction of up to 55% (TOLLENAAR et al. 1997). Therefore, genotype by far-

ming system interactions might be even more pronounced under those conditions and selecting in OF environments appears indispensable for making maximum progress in developing maize varieties for these conditions.

## References

- BURGER H, SCHLOEN M, SCHMIDT W, GEIGER HH, 2008: Quantitative genetic studies on breeding maize for adaptation to organic farming. *Euphytica* 163, 501-510.
- LORENZANA RE, BERNARDO R, 2008: Genetic correlation between corn performance in organic and conventional production systems. *Crop Sci* 48, 903-910.
- PRESTERL T, SEITZ G, LANDBECK M, THIEMT EM, SCHMIDT W, GEIGER HH, 2003: Improving nitrogen-use efficiency in European maize: Estimation of quantitative genetic parameters. *Crop Sci* 43, 1259-1265.
- RÖBER FK, GORDILLO GA, GEIGER HH, 2005: *In vivo* haploid induction in maize - performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica* 50, 275-283.
- TOLLENAAR M, AGUILERA A, NISSANKA SP, 1997: Grain yield is reduced more by weed interference in an old than in a new maize hybrid. *Agron J* 89: 239-246.
- WOLFE MS, BARESEL JP, DESCLAUX D, GOLDRINGER I, HOADS, KOVACS G, LÖSCHENBERGER F, MIEDANER T, OSTERGARD H, LAMMERTS VAN BUEREN ET, 2008: Developments in breeding cereals for organic agriculture. *Euphytica* 163, 323-346.

# Einsatz von Markern in der Getreidezüchtung zur Nutzung genetischer Ressourcen

## Use of markers in cereal breeding to exploit plant genetic resources

Michael Koch<sup>1\*</sup>, Jens Vaupel<sup>2</sup> und Brigitte Ruge-Wehling<sup>3</sup>

### Abstract

Plant genetic resources are of significance in delivering effective resistance genes. A lot of effective resistance genes were described in the past in *Hordeum bulbosum*. Because *H. bulbosum* needs to be forced to cross pollinate with *H. vulgare*, it belongs only to the secondary gene pool of barley. Therefore *H. bulbosum* was only marginally used in practical plant breeding so far. In the present paper the mapping of different resistance genes against Barley mild mosaic virus (BaMMV), Barley yellow mosaic virus (BaYMV), Leaf rust, Scald and Powdery mildew along with the development of DNA markers is summarized. In addition the ongoing integration of these resistance genes in breeding material by use of DNA markers, the yield performance of introgression lines and marker selected lines and its importance in respect to latest results of BaYMV-2 distribution in Germany is discussed.

### Keywords

Barley, *Hordeum bulbosum*, marker assisted selection, Barley yellow mosaic virus, plant genetic resources

Pflanzengenetische Ressourcen können zur Verbesserung von adaptierten Genotypen genutzt werden und vermeiden die Einengung der genetischen Diversität.

*H. bulbosum* bildet den sekundären Genpool der Gerste und stellt somit eine genetische Ressource dar. Artbastarde zwischen *H. bulbosum* und *H. vulgare* sind aufgrund prä- und postzygotischer Kreuzungsbarrieren sehr schwierig herzustellen. PICKERING (1988, 1992) und SZIGAT und SZIGAT (1991) berichteten über die erfolgreiche Erstellung von *H. bulbosum*-*H. vulgare*-Hybriden.

### Kartierung verschiedener Resistenzgene aus *H. bulbosum*

In verschiedenen Forschungsprojekten, die gemeinsam vom Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen (Julius-Kühn-Institut, Gross-Lüsewitz) und der Deutschen Saatveredelung AG durchgeführt wurden, konnten Resistenzgene gegen BaMMV, BaYMV-1, BaYMV-2, Mehltau, Zwergrost und Rhynchosporium kartiert werden,

die auf *H. bulbosum*-Introgressionen lokalisiert sind (RUGE et al. 2003, RUGE et al. 2005, RUGE-WEHLING et al. 2006, PICKERING et al. 2006) (Tabelle 1).

Im Rahmen der Kartierung konnten zu den Resistenzgenen eng gekoppelte Marker entwickelt werden, die für eine markergestützte Selektion genutzt werden können.

Abbildung 1 zeigt am Beispiel von *Rrs16Hb* die erfolgreiche Nutzung eines kartierten DNA-Markers in Zuchtmaterial. Im Vergleich zu den vorgefundenen *H. vulgare*-Allelen in den Kartierungspopulationen ist im Zuchtmaterial ein bis dahin unbekanntes *H. vulgare*-Allel zu beobachten.

### Ertragsprüfung von *H. bulbosum*-Introgressionslinien

In einer Ertragsprüfung wurden die *H. bulbosum*-Introgressionslinien, die als Resistenzspender in markergestützten Rückkreuzungsprogrammen genutzt werden, verglichen mit den beiden *H. vulgare*-Wintergerste-Rückkreuzungseltern der Introgressionslinien und aktuellen Wintergersten-Sorten. Als *H. vulgare*-Wintergerste-Rückkreuzungseltern für *H. bulbosum* wurden Borwina und Vogelsanger Gold genutzt. Als Versuchsdesign wurde eine Blockanlage mit einer Wiederholung gewählt. Die Ertragsprüfung erfolgte über zwei Jahre. Im ersten Jahr wurde an drei Orten, im zweiten Jahr an fünf Orten geprüft. Die *H. vulgare*-Wintergerste-Rückkreuzungseltern wurden nur im zweiten Jahr mitgetestet.

In beiden Prüfjahren lagen die Erträge der *H. bulbosum*-Introgressionslinien signifikant unter den Erträgen der aktuellen Wintergersten-Sorten. Im ersten Prüfjahr erreichten die *H. bulbosum*-Introgressionslinien im Mittel 70,4 dt/ha, die aktuellen Wintergersten-Sorten im Mittel

**Tabelle 1: Kartierte Resistenzgene aus *H. bulbosum* (RUGE et al. 2003, RUGE et al. 2005, RUGE-WEHLING et al. 2006, PICKERING et al. 2006)**

Resistenz	Lokalisation	Resistenzgen
BaMMV, BaYMV-1, -2	6HS	<i>Rym14Hb</i>
BaMMV, BaYMV-1, -2	2HL	<i>Rym16Hb</i>
<i>Blumeria graminis</i>	2HS	<i>MIHb</i>
<i>Puccinia hordei</i>	2HL	<i>Rph21Hb</i>
<i>Puccinia hordei</i>	5HL	<i>Rph22Hb</i>
<i>Rhynchosporium secalis</i>	4HS	<i>Rrs16Hb</i>

<sup>1</sup> Deutsche Saatveredelung AG, Thueler Straße 30, D-33154 SALZKOTTEN

<sup>2</sup> Deutsche Saatveredelung AG, Leutewitz 26, D-01665 KÄBSCHÜTZTAL

<sup>3</sup> Julius-Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, Gross-Lüsewitz, Rudolf-Schick-Platz 3a, D-18190 SANITZ

\* Ansprechpartner: Michael KOCH, koch@dsv-saaten.de



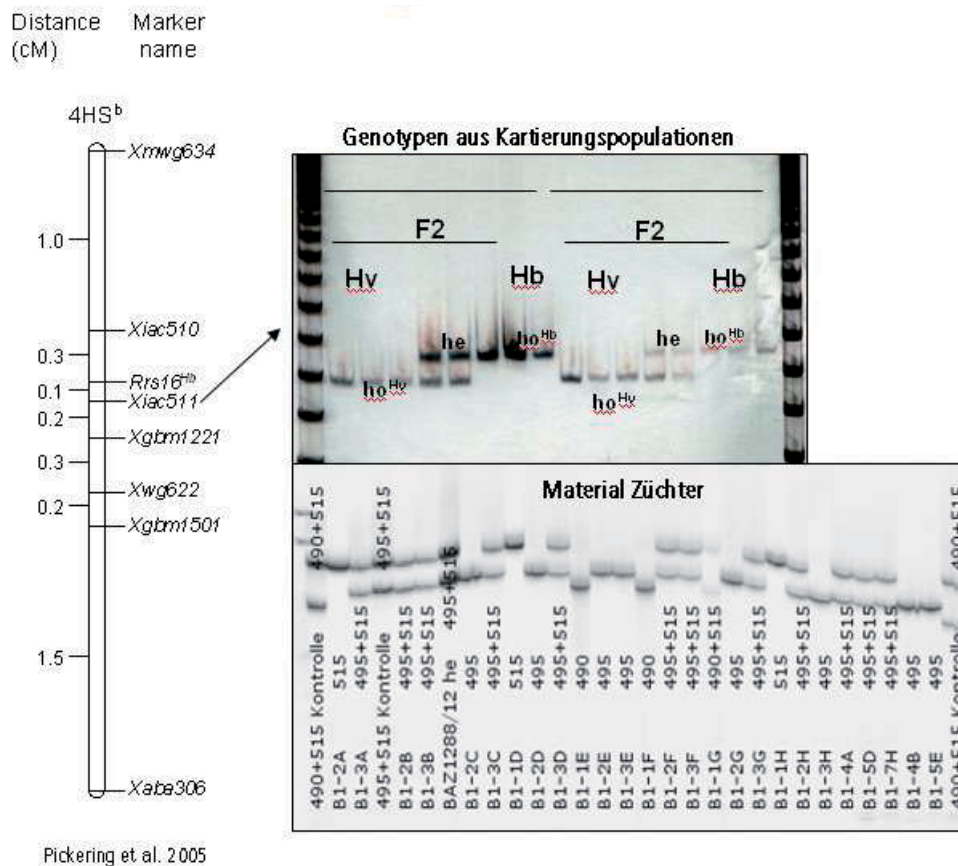


Abbildung 1: Selektionsmarker Xiac511 mit Kartenposition, Anwendung in zwei Kartierungspopulationen und in Zuchtstämmen

91,9 dt/ha bei einer Grenzdifferenz (5%) von 12,7 dt/ha. Im zweiten Prüfungsjahr wurden von den *H. bulbosum*-Introgressionslinien im Mittel 61,9 dt/ha, von den aktuellen Wintergersten-Sorten im Mittel 76,1 dt/ha geerntet, wobei die *H. vulgare*-Wintergerste-Rückkreuzungseltern mit 69,5 dt/ha bei einer Grenzdifferenz (5%) von 8,19 dt/ha als gleich mit den *H. bulbosum*-Introgressionslinien eingestuft werden können.

### Züchterische Weiterführung von *H. bulbosum*-Introgressionslinien

Die in Tabelle 1 beschriebenen Resistenzen aus *H. bulbosum* werden derzeit in aktuelles Zuchtmaterial eingelagert. Durch Nutzung der entwickelten Selektionsmarker werden Rückkreuzungsprogramme effizienter realisierbar.

Für die beiden *H. bulbosum*-Virusresistenzgene *Rym14Hb* und *Rym16Hb* wurde in eigenen Beobachtungen nachgewiesen, dass die Markerselektion effektiv ist. Beim Vergleich von Feldbonituren mit Markeresgebnissen über verschiedene Nachkommenschaften bestätigte die Feldbonitur die Markerselektion in den meisten Fällen.

Für Rückkreuzungsprodukte, die mit Marker auf Präsenz von *Rym14Hb* selektiert wurden, wurden ebenfalls Ertragsprüfungen im Rahmen des Zuchtprogrammes vorgenommen. Nachkommen mit *Rym14Hb* aus verschiedenen DH-Populationen wurden getestet im Vergleich zu mehrzeiligen Wintergersten-Sorten. Von diesen 28 Nachkommen mit

*Rym14Hb* wurden im Mittel 89,9 dt/ha gedroschen. Die mehrzeiligen Wintergersten-Sorten erbrachten 105,8 dt/ha im Mittel. Wobei *Rym14Hb* allerdings in zweizeilige Wintergersten eingelagert wurde, so dass die DH-Nachkommen mit *Rym14Hb* im Weiteren mit aktuellen zweizeiligen Wintergersten verglichen werden müssen.

### Neue Herausforderungen durch das Gelbmosaikvirus BaYMV-2

Die Nutzung von *Rym14Hb* und *Rym16Hb* für die Virusresistenz-Züchtung bei Wintergerste gewinnt an Bedeutung, bei Betrachtung der Verbreitung von BaYMV-2 in Deutschland.

HILGENSLOH et al. 2009 zeigten in einem Monitoring-Projekt, welches in 2008/09 durchgeführt wurde, dass BaYMV-2 in Nordrhein-Westfalen, Hessen und Süd-Niedersachsen an vielen Standorten nachgewiesen wurde. Somit ist auf diesen Flächen die bisher genutzte BaMMV- und BaYMV-1-Resistenz, welche in den meisten Wintergersten-Sorten vorhanden ist, nicht mehr nutzbar. Derzeit gibt es nur drei zugelassene Wintergersten-Sorten, die Resistenz gegen BaYMV-2 tragen und dementsprechend auf BaYMV-2-Befallsstandorten angebaut werden könnten (ANONYMOUS 2009).

Sowohl *Rym14Hb* als auch *Rym16Hb* verleihen Resistenz gegen diesen Virus-Typ und stellen damit eine Alternative zur Züchtung auf BaYMV-2-Resistenz dar.

## Schlussbetrachtung

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen ist die Erschließung der genetischen Ressource *H. bulbosum* mit erheblichem züchterischen Aufwand verbunden. Basismaterial mit Resistenzgenen gegen wichtige Krankheiten konnte erstellt und Resistenzgene aus *H. bulbosum* kartiert werden. Zugleich wurden als Selektionshilfe eng gekoppelte Marker entwickelt, die es ermöglichen, die Resistenzgene effizient zu selektieren. Allerdings zeigten *H. bulbosum*-Introgressionslinien niedrigere Erträge in Leistungsprüfungen.

Vor dem Hintergrund der breiten Verbreitung von BaYMV-2 ist eine frühzeitige Resistenzzüchtung auf einer möglichst breiten Resistenzbasis wünschenswert.

## Danksagung

*H. bulbosum*-Introgressionslinien wurden von M. Michel und Dr. R. Pickering erstellt. Die Resistenztests konnten freundlicherweise von Dr. G. Proeseler, Dr. A. Habekuß und Dr. G. Schweizer und ihren Mitarbeitern durchgeführt werden. Elementar im Hinblick auf die Markerentwicklung waren die Arbeiten von Dr. B. Ruge-Wehling und ihrem Team.

## Literatur

ANONYMOUS, 2009: Beschreibende Sortenliste 2009, 20-28.

- HILGENSLOH S, SÜNDER A, HÜSEMANN A, WELLIE-STEPHAN O, SCHÄFER BC, RABENSTEIN F, 2009: BaYMV-2 schon weiter verbreitet als angenommen. *GetreideMagazin* 4/2009, 206-209.
- PICKERING RA, 1988: The production of fertile triploid hybrids between *Hordeum vulgare* L. ( $2n = 2x = 14$ ) and *H. bulbosum* ( $2n = 4x = 28$ ). *Barley Genet Newslett* 18, 25-29.
- PICKERING RA, 1992: Monosomic and double monosomic substitutions of *Hordeum bulbosum* L. chromosomes into *H. vulgare* L. *Theor Appl Genet* 84, 466-472.
- PICKERING R, RUGE-WEHLING B, JOHNSTON PA, SCHWEIZER G, ACKERMANN P, WEHLING P, 2006: The transfer of a gene conferring resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*) from *Hordeum bulbosum* into *H. vulgare* chromosome 4HS. *Plant Breeding* 125, 576-579.
- RUGE B, LINZ A, PICKERING R, PROESELER G, GREIF P, WEHLING P, 2003: Mapping of *Rym14Hb*, a gene introgressed from *Hordeum bulbosum* and conferring resistance to BaMMV and BaYMV in barley. *Theor Appl Genet* 107, 965-971.
- RUGE B, LINZ A, ACKERMANN P, HABEKUSS A, SCHWEIZER G, PICKERING R, WEHLING P, 2005: Kartierung von Resistenz bedingenden *Hordeum bulbosum*-Introgressionen im Gerstengenom. *Vortr Pflanzenzüchtg* 67, 166-177.
- RUGE-WEHLING B, LINZ A, HABEKUSS A, WEHLING P, 2006: Mapping of *Rym16Hb*, the second soilborne virus-resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum*. *Theor Appl Genet* 113, 867-873.
- SZIGAT GI, SZIGAT GE, 1991: Amphidiploid hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum* - basis for the development of new initial material for winter barley breeding. *Vortr Pflanzenzüchtg* 20, 34-39.

# Molekulare Marker in der praktischen Weizenzüchtung bei RAGT

## Use of molecular markers in the wheat breeding programme of RAGT

Hilmar Cöster<sup>1\*</sup>

### Abstract

Wheat breeding at RAGT is routinely using molecular markers. Breeding for resistance to Fusarium head blight (FHB) is shown as an example for marker application. Four populations from parents of the European gene pool were developed for QTL discovery. The dwarfing gene *Rht-D1b* (*Rht2*) was the most important QTL for Fusarium susceptibility.  $R^2$  of nearly all other QTLs was below 10%. Implications for breeding are discussed. Exotic new sources of FHB resistance were backcrossed into adapted varieties. Some of these can increase the resistance level of susceptible varieties significantly. QTL discovery is in development. Resistance to soil borne mosaic viruses is shown as another example. Markers were developed through bulk segregant analysis of advanced lines of known resistance. The discovered marker has been routinely used over many years. It has replaced the conventional pathology assay. Marker application in pre-breeding and in the normal breeding process is also described.

### Keywords

Cereal virus diseases, Fusarium head blight, QTL, *Triticum aestivum*

### Einleitung

Das Weizenprogramm von RAGT geht ursprünglich auf die Züchtung des Plant Breeding Institutes (PBI) der Universität Cambridge zurück. 1987 wurde es privatisiert und an Unilever verkauft. 1998 übernahm Monsanto das Zuchtprogramm. Es wurde in Markertechnologie investiert und eine genetische Karte des Weizens mit ca. 2000 Mikrosatelliten (SSR) Markern entwickelt. 50% der Marker sind aus der öffentlichen Forschung, 50% selbst entwickelt. Im Jahr 2004 ging die Getreidezüchtung an RAGT, eine französische Saatgut- und Agrarhandelsfirma. Es werden

weiterhin Marker entwickelt und als Routineanwendung in der Züchtung eingesetzt.

### Resistenzzüchtung gegenüber Ährenfusarium (*Fusarium* spp.)

Anfang der 1990-iger Jahre erwiesen sich kurzstrohige hochertragreiche Winterweizensorten als sehr anfällig gegenüber Ährenfusarium. Eine Verbesserung der Resistenz war dringend nötig. Neben den grundsätzlichen Überlegungen der Kreuzungsauswahl, des erstrebten Sortentyps, usw. stellte sich die Frage der Selektionsstrategie.

### Markergestützte Selektion (MAS)

Die konventionelle Feldselektion sollte durch markergestützte Selektion ergänzt werden. Dazu wurden 4 QTL Kartierungspopulationen entwickelt (Tabelle 1).

Die Eltern der ersten Population haben beide das Verzweigungsgen *Rht-D1b* (*Rht2*). Unabhängig von der Pflanzenhöhe sollten Resistenz QTLs gefunden werden. Enttäuschenderweise ergab die Analyse keine QTLs mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2 > 10\%$ . Effekte einzelner QTLs konnten zwar in anderen Kreuzungen nachgewiesen werden, waren aber sehr klein.

Die Eltern der Population Centrum  $\times$  Macro zeigen große Unterschiede in der Resistenz gegenüber Fusarium und der Pflanzenhöhe. Centrum hat kein bekanntes *Rht* Gen, Macro *Rht2*. Dieses Verzweigungsgen erhöht die Anfälligkeit (20% der erklärten phänotypischen Varianz). Außerdem konnte ein weiterer QTL mit  $R^2 = 18\%$  gefunden werden, der sich auch im Zuchtmaterial an anderen Kreuzungen mit Centrum bestätigen ließ.

Die Population Romanus  $\times$  Pirat wurde im Rahmen eines GFP-Projektes untersucht. Auch hier hatte das *Rht2* Gen den größten Effekt. Weitere entdeckte QTL waren mit  $R^2 < 10\%$  relativ klein (GFP-Projekt Verringerung des Mykotoxingehaltes von Weizen bei Befall mit Ährenfusariosen)

Tabelle 1: QTL Kartierungspopulationen für Resistenz gegen Ährenfusarium (FHB)

Table 1: QTL mapping populations for Fusarium head blight (FHB) resistance, FHB resistance score of parental genotypes in parentheses (1, resistant; 9, very susceptible), number of test environments and  $R^2$  of dwarfing genes and resistance QTLs

Kreuzung / Fusarium Resistenz (APS)	<i>Rht</i> Gen	Prüfumwelten	$R^2$ <i>Rht</i> Gene (%)	$R^2$ der größten QTLs (%)
Kris (7) $\times$ Corvus (4)	<i>Rht2</i> / <i>Rht2</i>	8	-	10, 9, 8
Centrum (2) $\times$ Macro (8)	- / <i>Rht2</i>	3	20	18, 7, 6, 6
Romanus (2) $\times$ Pirat (7)	- / <i>Rht2</i>	5	28	8
Cliff (6) $\times$ Hermann (3)	<i>Rht2</i> / <i>Rht1</i>	4	26	8, 8, 6

<sup>1</sup> RAGT 2n, Steinesche 5A, D-38855 SILSTEDT

\* Ansprechpartner: Hilmar CÖSTER, hcoester@ragt.fr

durch zuchtmethodische Verfahren, VOSS et al. 2008, HOLZAPFEL et al. 2008).

Die Population Cliff × Hermann weist zwei verschiedene *Rht* Gene auf, nämlich *Rht-D1b* (*Rht2*) und *Rht-B1b* (*Rht1*). Beide Verzweigungsgene erklären den größten Teil der Varianz im Durchschnitt von  $R^2 = 28\%$ . Auch hier bleiben die weiteren QTLs relativ klein.

Welche Schlussfolgerungen können daraus für die Züchtung gezogen werden? Die Verzweigungsgene haben im untersuchten europäischen Formenkreis den größten Effekt auf die Fusariumanfälligkeit. Die Züchtung hat folgende Optionen: (1) Verzucht auf *Rht1* und *Rht2*, um die Fusariumresistenz zu erhöhen; (2) Nutzung anderer Verzweigungsgene oder (3) kurze Sorten mit *Rht1* oder *Rht2* mit quantitativen Resistenzen anreichern, um negative Effekte auszugleichen.

### Introgression exotischer Resistenzquellen

Die Resistenz von Sumai 3 ist in der Literatur mehrfach beschrieben und bestätigt worden (BÜRSTMAYR et al. 2009). Auch im Zuchtmaterial konnten nach mehrfacher Rückkreuzung Linien mit deutlich verbesserter Resistenz gefunden werden (Sumai QTLs auf 3B und 5A). Bei RAGT wurden im Rahmen der Vorzüchtung (prebreeding) eine größere Anzahl exotischer Resistenzquellen von CIMMYT und anderen Institutionen bearbeitet. Nach umfangreichen Resistenzprüfungen wurden Rückkreuzungen mit anfälligen adaptierten Winterweizensorten durchgeführt. Eine Auswahl der nach verschiedenen Selektionsschritten erhaltenen besten Resistenzquellen und besten Rückkreuzungslinien ist in *Tabelle 2* dargestellt. Die angeführten Linien sind als Winterform mit ähnlichem Datum für das Ährenschieben gut mit den rekurrenten Eltern vergleichbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, solche Resistenzen in hiesiges adaptiertes Material zu übertragen. Trotz der Rückkreuzung mit sehr anfälligen Eltern kann das Ni-

veau von resistenten Sorten wie Esket und Centrum erreicht werden. QTL Analysen werden momentan durchgeführt.

### Feldselektion von Kreuzungen europäischer Winterweizen

Durch entsprechende Kreuzungsplanung und konsequente Feldselektion konnte die Anfälligkeit der eigenen zugelassenen Sorten von hoch bis sehr hoch (APS 8) auf gering (APS 3) reduziert werden. Die Ausprägungsstufen (APS) werden vom deutschen Bundessortenamt nach umfangreichen Prüfungen durch das Julius-Kühn Institut (Dr. Rode mann) festgesetzt (bis 2002 Fusarium Sprühinfektion, ab 2002 Fusariuminfektion nach der Maisstoppelmethode). *Abbildung 1* zeigt die Sorten der Zulassungsjahre 1996 bis 2008 aus dem deutschen Zuchtprogramm (PBI, Monsanto, RAGT). Diese Aufstellung beschränkt sich nur auf eine Auswahl von Sorten mit dem Verzweigungsgen *Rht2*. Das heißt, die anfälligeren kurzen Sorten konnten durch die Anreicherung von positiv wirkenden Resistenzgenen deutlich verbessert werden.

Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die konventionelle Züchtung mit sorgfältig durchgeführten Feldprüfungen nach wie vor eine wesentliche Säule der Sortenentwicklung bleibt. Die oben genannten Markeranalysen haben aber neue Erkenntnisse über die Wirkung der Verzweigungsgene auf die Fusariumanfälligkeit gebracht. Inwieweit Marker für kleinere QTLs in der Züchtung genutzt werden sollten, sei dahingestellt. Für die Einlagerung von neuen Resistenzquellen sind die Marker jedoch eine wesentliche Hilfe. Erfahrungsgemäß bringt hier die markergestützte Selektion in Verbindung mit der Resistenzprüfung auf dem Feld die besten Ergebnisse (siehe auch MIEDANER et al. 2008). Die nächsten Jahre werden zeigen, ob es gelingt, neue exotische Resistenzen in Sorten einzulagern und damit der Landwirtschaft nutzbar zu machen.

**Tabelle 2: Rückgekreuzte Resistenzquellen im Vergleich zu den rekurrenten Eltern. Ergebnisse aus der Sprühinfektion mit *Fusarium culmorum*, Silstedt (FHB, Mittel aus 3 Fusarium-Bonituren; DTAE, Datum Ährenschieben; jeweils 2 Versuchswiederholungen)**

**Table 2: Fusarium head blight resistance of backcross resistance sources with exotic resistance sources in comparison to their recurrent parent. Results from field experiments (2 replications) in Silstedt with artificial inoculation with *F. culmorum* (FHB, mean of 3 scoring dates; DTAE, date of heading (DDMM))**

Rückgekreuzte Resistenzquellen im Vergleich zu den rekurrenten Eltern	2007 FHB	2008 DTAE	2008 FHB	2009 DTAE	2009 FHB
Clarus	5,7	03/06	4,7	02/06	4,7
Linie 1 (Resistenz A / Clarus BC1)	4,0	03/06	1,5	25/05	2,3
Linie 2 (Resistenz A / Clarus BC1)	3,8	02/06	1,8	31/05	2,8
Macro	6,3	02/06	5,2	27/05	8,0
Linie 3 (Resistenz B / Macro BC1)	4,8	01/06	2,5	26/05	3,3
Opus	5,3	04/06	4,7	01/06	6,7
Linie 4 (Resistenz B / Opus BC1)				27/05	2,8
Macro	6,0	01/06	6,7	27/05	7,8
Linie 5 (Resistenz C / Macro BC1)	4,0	01/06	1,8	28/05	2,5
Candidat	5,8	03/06	4,5	30/05	7,0
Linie 6 (Resistenz C / Candidat BC1)				27/05	4,7
Esket	2,8	03/06	1,8	01/06	2,7
Centrum	2,9	02/06	1,7		

### Resistenzzüchtung gegenüber bodenbürtigen Viren

Bodenbürtige Viren (SBCMV, *soil borne cereal mosaic virus*; WSSMV, *wheat spindle streak mosaic virus*) sind besonders in Frankreich ein bedeutender Schädling, breiten sich aber auch in Deutschland und Großbritannien aus. Sie werden von einem Bodenpilz (*Polymyxa graminis*) übertragen. Die einzige Lösung zur Bekämpfung sind resistente Weizensorten. Die Resistenzprüfung im Feld ist nicht ganz einfach, da man ein gleichmäßig verseuchtes Feld braucht und spaltende Generationen schwierig zu beurteilen sind.

Im französischen Zuchtprogramm von RAGT (Christophe Michelet, Yann Manes) stellte sich deshalb vor mehr als 10 Jahren die Frage nach markergestützter Selektion. Zunächst konnten anhand vorhandener Daten eine einfache auf einem Gen beruhende Vererbung vermutet und Resistenzträger identifiziert werden. Dann wurde an Zuchtstämmen mit bekanntem Resistenzstatus und an resistenten und anfälligen Ramschen aus denselben Kreuzungen bzw. Nachkommenschaften eine sogenannte *Bulk Segregant Analysis* durchgeführt. Nach einem Screening von ca. 1600 Markern gelang es, Markerkandidaten zu identifizieren. Diese wurden dann an 400 Zuchtstämmen validiert und eine Kartierungspopulation erstellt. Das Ergebnis ist in *Abbildung 2* zu sehen. Der Marker für die identifizierte *Sbm1* Resistenz wird seit Jahren routinemäßig angewandt und ersetzt die konventionelle Feldprüfung des jungen Zuchtmaterials (siehe auch PEROVIC et al. 2008).

Dieses Beispiel zeigt, dass die Anwendung der markergestützten Selektion eine deutliche Verbesserung und Vereinfachung der Selektion ermöglicht.

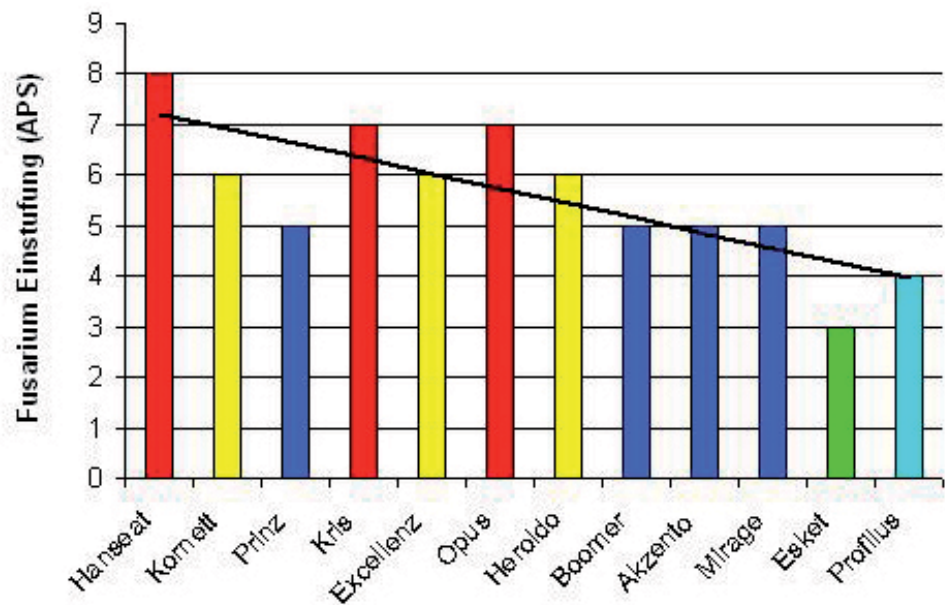


Abbildung 1: Kurzstrohige Sorten und deren Anfälligkeit gegenüber *Fusarium* ssp. aus den deutschen Sortenzulassungen der Jahre 1996 bis 2008

Figure 1: Semi-dwarf winter wheat varieties released in Germany in the years 1996 to 2008 and their susceptibility against *Fusarium* head blight

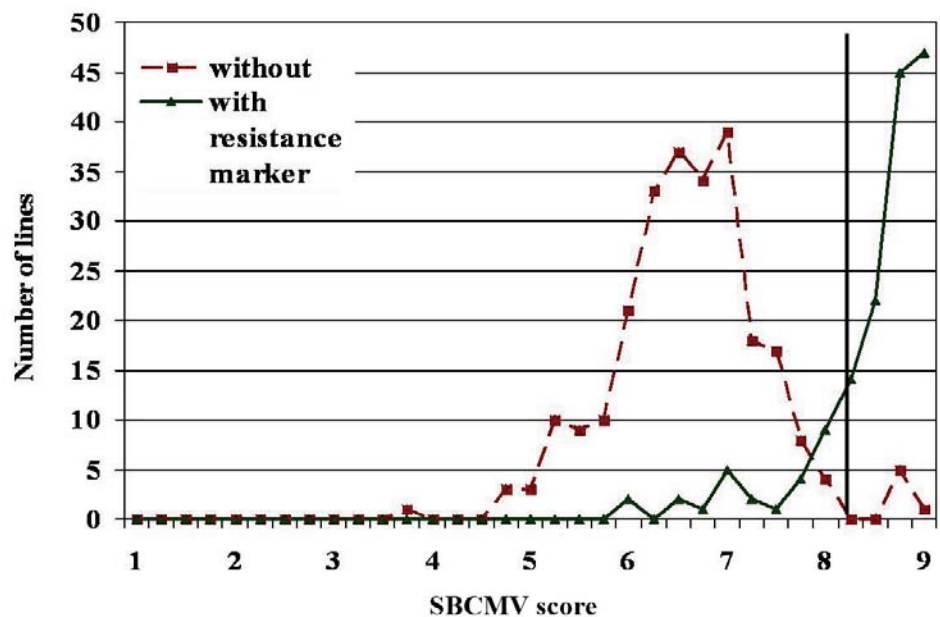


Abbildung 2: Anzahl an F6/F7-Linien des französischen Weizenzüchtungsprogramms (1998/1999) mit den entsprechenden SBCMV Bonituren (1, anfällig; 9, resistent) mit oder ohne markerdetektierter Resistenz

Figure 2: Number of F6/F7 lines from the French wheat breeding programme (1998/1999) and their susceptibility to SBCMV (1, susceptible; 9, resistant) developed with or without resistance marker

### Validierung von molekularen Markern

Ehe molekulare Marker in der praktischen Züchtung angewendet werden können, müssen nach der Entdeckung der QTLs noch wesentliche Arbeiten zur Validierung erledigt werden, die hier nur stichwortartig erwähnt wer-

den sollen: Feinkartierung, Prüfung der Übertragbarkeit auf anderes Material (andere Populationen, unselektierte Züchtungsgenerationen), allelischer Effekt (Wie sieht der Vergleich des entdeckten QTLs zu anderen Allelen aus, die nicht in der Kartierungspopulation geprüft wurden?) und NIL (Möglichkeit der Überprüfung der Wirksamkeit an nahisogenen Linien)

### Anwendung von molekularen Markern

Bei der züchterischen Verwendung von neuen Eigenschaften oder Resistenzgenen leistet die Markertechnologie einen wesentlichen Beitrag. Neue Gene können besser lokalisiert und charakterisiert werden. Es ist möglich, die Introgression gezielter einzulagern und das Fragment zu verkleinern. Rückkreuzungsschritte bis zur Sortenentwicklung können zügig durchgeführt werden.

Im Züchtungsprozess können molekulare Marker angewendet werden zum Screening und der Auswahl von Kreuzungseltern (Identifikation von wichtigen Genen, z.B. *Rht* Gene, Resistenzen, etc.), der Selektion der F1 von 3-Wege-Kreuzungen, MAS in jungen Generationen (Hier sind einige konkrete Fragen zu stellen: Welche Eigenschaften? Bringt die MAS im Vergleich zur Feldselektion Vorteile? Welche Marker sind vorhanden? In welcher Generation soll selektiert werden?), der Analyse fortgeschrittener Zuchtlinien und der Erhaltungszüchtung und Sortenreinheit.

Grundsätzlich stellt sich bei der praktischen Anwendung die Frage, ob die QTL Entwicklung nicht oft zu spät kommt, also nur analysiert und beschreibt, was schon bereits in der Züchtung gemacht wurde. Zum Beispiel sind Kreuzungen mit interessanten Eltern aus dem Zuchtprogramm nach der QTL Analyse bereits in fortgeschrittenen Generationen, sodass es keinen Sinn ergibt, an diesen die MAS noch anzuwenden. Zur sinnvollen Anwendung gehört die Interaktion zwischen Züchtern und Markerexperten, um die Markerentwicklung und -anwendung dynamisch fortzuentwickeln.

### Ausblick

Die Entwicklung von neuen Markern ist ein sehr kostenintensiver Prozess, der von den privaten Züchtern allein nicht zu bewältigen ist. Besonders bei der Nutzbarmachung von neuen Resistenzen und speziellen Eigenschaften im Bereich der Vorzüchtung (Prebreeding) und der damit verbundenen

Markerarbeit ist die öffentliche Forschung gefragt. Aber auch große Themen, wie das der Markerentwicklung für die Ertragszüchtung, können von einzelnen Züchtungsfirmen nicht alleine bearbeitet werden. Umgekehrt wird die Forschung von den Anregungen und Fragestellungen der Züchtung stimuliert und kann gegebenenfalls auf Züchtungsmaterial zurückgreifen. Eine enge Kooperation geschieht deshalb im gegenseitigen Nutzen.

Die Anwendung von Markern im praktischen Zuchtbetrieb, muss wie an den Beispielen aufgezeigt differenziert betrachtet werden. So bleibt es jeder Züchterin, jedem Züchter selbst überlassen, je nach vorhandenen Ressourcen zu entscheiden, ob, wie und in welchem Umfang Marker eingesetzt werden sollen.

### Danksagung

Markerteam in Cambridge, jetzt Ickleton: Dr. Peter Jack, Chris James. Weizenzüchtungsteam in Silstede: Andreas Fürste, Uta Liesenberg. RAGT Getreide Züchtungsteams in Ickleton (GB), Louville la Chenard (F) und Branisovice (CZ). GFP Fusarium Projektgruppe.

### Literatur

- BÜRSTMAYR H, BAN T, ANDERSON JA, 2009: QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding* 128, 1-26.
- HOLZAPFEL J, VOSS HH, MIEDANER T, KORZUN V, HÄBERLE J, SCHWEIZER G, MOHLER V, ZIMMERMANN G, HARTLL, 2008: Inheritance of resistance to Fusarium head blight in three European winter wheat populations. *Theor Appl Genet* 117, 1119-1128.
- MIEDANER T, WILDE F, KORZUN V, EBMEYER E, 2008: Phenotypic selection for high resistance to Fusarium head blight after introgression of quantitative trait loci (QTL) from exotic spring wheat and verification by simple sequence repeat markers a posteriori. *Plant Breeding* 127, 217-221.
- PEROVIC D, FÖRSTER J, DEVAUX P, HARIRI D, GUILLEROUX M, KANYUKA K, LYONS R, WEYEN J, FEUERHELM D, KASTIRR U, SOURDILLE P, RÖDER M, ORDON F, 2009: Mapping and diagnostic marker development for *Soil-borne cereal mosaic virus* resistance in bread wheat. *Mol Breed* 23, 641-653.
- VOSS HH, HOLZAPFEL J, HARTL L, KORZUN V, RABENSTEIN F, EBMEYER E, CÖSTER H, KEMPF H, MIEDANER T, 2008: Effect of the *Rht-D1* dwarfing locus on Fusarium head blight rating in three segregating populations of winter wheat. *Plant Breeding* 127, 333-339.

## Utilization of molecular markers in Czech wheat breeding programmes

Pavel Horčíčka<sup>1,2</sup>, Alena Hanišová<sup>1</sup>, Karla Řehořová<sup>1</sup>, Ondřej Veškrna<sup>2</sup>,  
Tereza Kašová<sup>2</sup>, Tibor Sedláček<sup>2</sup>, Jana Chrpová<sup>3</sup>, Václav Šíp<sup>3</sup> and Lenka Štočková<sup>3</sup>

### Abstract

Selection by molecular markers (MAS) might be an efficient breeding tool especially for programmes of strategic importance, where other test procedures are not effective, costly or difficult. The advantage of molecular markers can be also time, when breeders can receive information about the location of target genes in the plant or progeny. The Czech breeding company Selgen has utilized markers for a couple of decades. Determination of baking quality by protein markers is applied extensively and effectively especially in regard to the determination of low baking quality. Breeding for BYDV resistance was enhanced by the *Bdv2* marker. Fusarium head blight is widely studied and Sumai 3 based markers are already used but further studies are required. From our experiments it can be concluded that small and medium size breeding companies need a broad cooperation with universities and public research institutions to develop and utilize new markers.

### Keywords

Baking quality, barley yellow dwarf virus, Fusarium head blight, selection, *Triticum aestivum*

### Introduction

Practical breeding is different from academic research because new cultivars must combine many useful traits, not only one, two or three of them. The optimum numbers of plants and progenies for populations are growing with the selection of every new trait. Phenotype based selection for agronomically important traits is straightforward but it has several limitations. Environmental influence on symptom expression may result in inaccurate classification and for some traits phenotyping is costly and time consuming. Hence, selection by molecular markers, so called marker assisted selection (MAS), might be an efficient breeding tool especially for programmes of strategic importance, where other test procedures are not effective, costly or difficult. Some authors also stated that the number of crosses and tested progenies can be reduced (KNAPP 1998). In plant breeding the application of molecular markers can be carried out for several breeding steps: parental selection for crossing, backcrossing, three way crossing, segregating populations, plant (ear) progenies ( $F_3$ ,  $F_4$ ) and juridical protection of cultivars. The advantage of molecular markers is

also time, when breeders can receive information about the location of target gene(s) in plant or progeny. For parental selection and crossing programmes we need the information before flowering, for  $F_2$ ,  $F_3$  and plant progenies before selection for harvest. The time limitation is important for consideration about numbers of populations planned for MAS. KOEBNER and SUMMERS (2003) reported three main advantages of MAS: (i) possibility to select on single plant bases, (ii) selection for traits under multigenetic control and (iii) detection of recessive genes in early generations and for backcross programmes.

### Quality breeding and MAS

We would like to demonstrate our experience with markers in the wheat breeding programme of the plant breeding station Stupice. In wheat progress gene identification and marker development have been slow due to the hexaploid nature and large size of the wheat genome. In our wheat breeding programme attention to the improvement of protein composition is paid. Biochemical markers for baking quality, for frost resistance and disease resistance have been used. Electrophoretic analyses for glutenin and gliadin subunits are included on a broad scale since the last 30 years (ŠAŠEK et al. 1982, 1984). Annually 60-80 crosses of winter and spring wheat have been analyzed. Gliadin markers were partly also used for frost resistance selection. The correlation with our tests for frost resistance was high ( $r=0.44-0.61$ ) (ŠAŠEK et al. 1982, 1984). Also widely used was protein marker *EP-D1b*, which predicts the presence of *Pch1*, the gene conferring resistance to eyespot. Unfortunately *Pch1* gene is negatively correlated with yield potential and our new breeding lines with eyespot resistance were not registered (HANIŠOVÁ et al. 1993).

Biochemical markers have been applied for parents and plant progenies in  $F_3$  and  $F_4$  ( $F_3$ ) generations and for maintenance breeding. For classical electrophoresis from one grain we need at least 5 analyses per progeny. To increase the labour capacity the method of mixed samples was developed (KUBÁNEK et al. 1999). The mixed samples from plant progenies, rests after sowing (20-100 grains), are used for analyses. The codominant heritability enables to detect parental or recombinant gametes, homozygous or segregating progenies in HMW glutenin subunits. The effect of HMW glutenin subunits on the final baking quality and final quality group is not directly related. It is evident that

<sup>1</sup> SELGEN a.s., Jankovcova 18, CZ-170 37 PRAHA 7

<sup>2</sup> Research Centre SELTON, Ltd., Stupice 24, CZ-25084 SIBRINA

<sup>3</sup> Research Institute of Crop Protection, Drnovska 507, CZ-161 06 PRAHA 6 - RUZYNE

\* Ansprechpartner: Dr. Pavel HORČIČKA, horcicka@selgen.cz

**Table 1: Baking quality, Payne score (PAYNE and LAWRENCE 1983) and HMW glutenin subunits of registered varieties in Czech Republic**

Variety	Baking quality (UKZUZ)	Payne score	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1	1BL/1RS
Vlasta	B	10	1	7+8	5+10	
Akteur	E	9	1	7+9	5+10	
Sulamit	E	8	0	17+18	5+10	
Bohemia	A	8	0	17+18	5+10	
Alana	A	8	0	7+8	5+10	
Samanta	B	8	0	7+8	5+10	
Sakura	C	8	0	7+8	5+10	
Cubus	A	7	0	7+9	5+10	
Dromos	C	7	1	7+9	2+12	
Ludwig	A/E	6	0	6+8	5+10	
Kerubino	A	5	0	7+9	2+12	
Rapsodia	C	4	0	17+18	2+12	+
Hedvika	B	4	0	6+8	2+12	
Etela	C	3	0	6+8	2+12	+

the presence of the 1BL/1RS translocation always predicts low baking quality (Table 1).

### Disease resistance breeding and MAS

For MAS in wheat an increasing number of agronomically important genes have been tagged with linked microsatellite markers in recent years. Most of them are resistance genes. Some of the markers are not effective anymore since the resistance genes were overcome, others, however, are already used in many programmes for a long time.

Selgen decided to apply MAS for traits which are difficult to evaluate with conventional methods, i.e. in resistance breeding against Fusarium head blight (FHB) and barley yellow dwarf virus (BYDV). Some resistance sources were used in these programmes for a long time, but with low effectiveness, because the screening in early generations was not possible by field test methods.

Resistance programme to virus diseases was started in 1992 in artificial infection tests in the Research Institute Praha-Ruzyně by Ing. J. Vacke. In these tests 15-20 breeding lines of winter and 10-15 lines of spring wheat were tested annually. Two winter wheat cultivars showed moderate resistance and two resistant lines, SG-S604-96 and SG-S26-98, were selected in spring wheat (BARTOŠ et al. 2002).

Resistance sources from the CIMMYT programme and translocated lines from *Thinopyrum intermedium* with known molecular markers for BYDV resistance were crossed in the wheat breeding programme of breeding station Stupice since 1997. Until now only the *Bdv2* marker was used for these crosses. The marker looked very promising due to a positive effect of the presence of *Bdv2* on absorbances in the infected plant leaves (Figure 1). In contrary, the effect of *Bdv2* on field evaluation after artificial inoculation with BYDV-PAV was very variable (Figure 2).

Fusarium head blight (FHB) is one of the most destructive diseases of wheat causing reductions in grain yield and

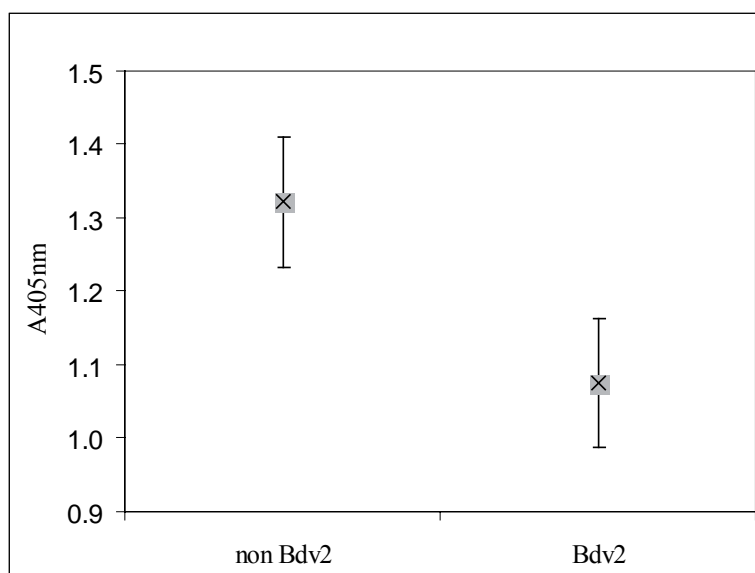


Figure 1: Average absorbances in the infected plant leaves on the 11<sup>th</sup> day after inoculation with BYDV-PAV (ELISA, 405nm) and 95% Tukey HSD for groups of *Bdv2* and non-*Bdv2* spring wheat lines (VESKRNA et al. 2009)

quality. FHB resistance breeding via traditional methods is difficult because resistance is quantitative in nature and incomplete. In addition, the most resistant sources are not adapted, susceptible to other diseases and have poor combining ability (CHEN et al. 2003). Conventional testing of FHB resistance is also very costly. In the Selgen wheat breeding programme at Stupice FHB tests cost approx. 65 € per line. Markers have been proven to be a powerful tool for tagging genes associated with FHB resistance. For the use in breeding programmes, we developed STS markers for the 3BS QTL region, which was found to be more frequently transferred into recurrent backgrounds (CHEN et al. 2003). Crosses with sources for which molecular markers were described (e.g. Sumai 3, Ning 7840, CM 82036, Ernie, etc.) were prepared. We would like to control backcrossing programmes on plants and plant progenies by MAS. The effect of the presence of QTL on FHB infection in the F<sub>2</sub> population of the cross Sumai 3×Swedjet was tested. The presence of two markers 5A+3BS increased the ratio of plants with higher resistance, but still some percentage of



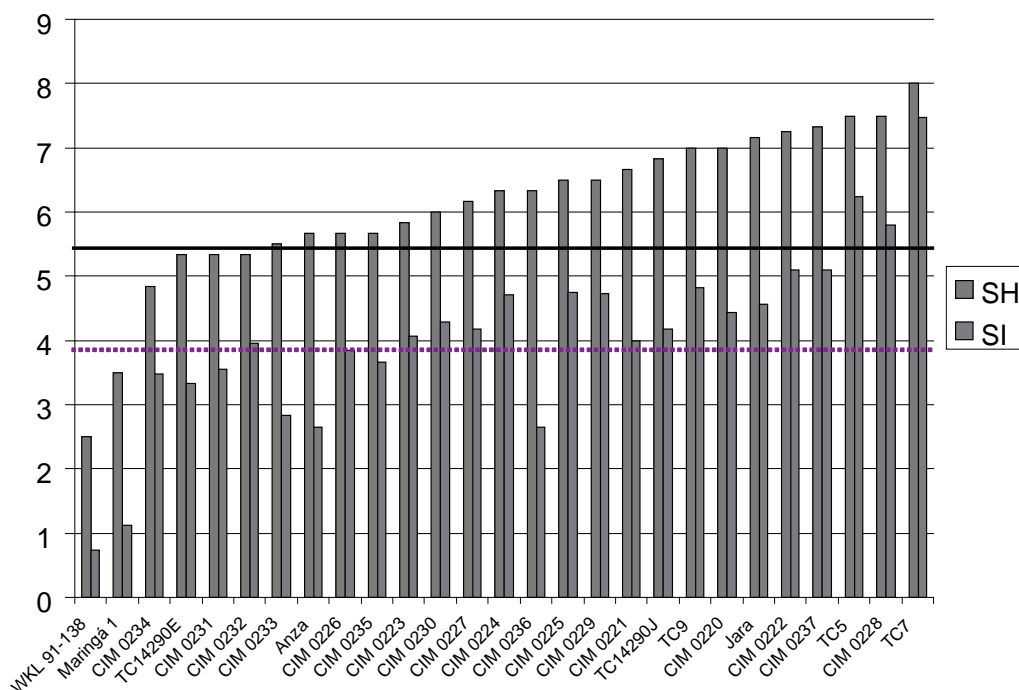


Figure 2: Symptom evaluation (SH) and symptomatic index (SI) (0 resistant, 9 susceptible) of spring wheat (*Bdv2* positive) after artificial inoculation by BYDV-PAV (VESKRNA et al. 2009)

susceptible ones were present (Figure 3). There is a number of plants with no verified marker for FHB resistance. After further selection of the best 10 lines in F<sub>5</sub> FHB occurrence and DON content were evaluated. The group with the 3BS marker had lower DON content and lower FHB occurrence (Table 2). Resistance of non-marker plants was lower, but the best lines were comparable to marker-positive ones. Many present varieties with good FHB resistance (e.g. Sakura, Simila, etc.) were selected by classical methods in the breeding station Stupice. Field tests demonstrated the broad variation of FHB resistance between different varieties and the low effect of fungicides (Table 3).

Breeders need to modify breeding methodology continuously. Breeders should increase collaboration with molecular genetics, plant pathologists and other research workers. MAS is a type of indirect selection and breeders would like to use it more and more in the future. The extent of their application in breeding process depends on: (i) sources with desired resistance or other useful traits, (ii) number of markers,

Table 2: Effect of the presence of the 3BS FHB marker on FHB infection occurrence and DON content in the best 10 F<sub>5</sub> breeding lines of Sumai 3×Swedjet

Genotype/Marker	FHB (%)			DON (ppm)		
	average	min	max	average	min	max
Sumai 3×Swedjet F <sub>5</sub>						
533 3BS	6,8	7	10	12,2	5,0	21,3
none	11,6	5	20	17,5	9,3	23,7
Swedjet	50,0			35,0		
Sumai 3	5,0			14,0		

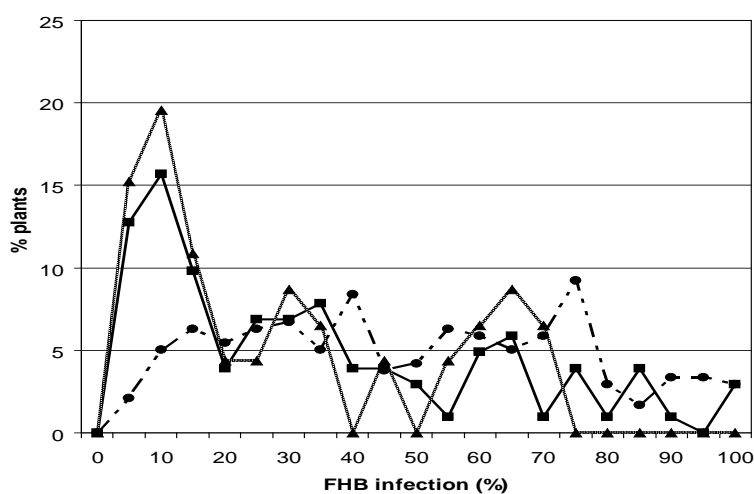


Figure 3: Effect of the presence of FHB resistance QTLs (▲ 5A+3BS, ■ 3BS, ● none) on infection level in the F<sub>2</sub> population of Sumai 3×Swedjet

(iii) number of entries and (iv) working capacities. Costs of analyses and especially reliability of markers in breeding programmes will play more and more important role.

Table 3: Variety group (R, medium tolerant; M, medium susceptible; S, susceptible) means of inoculated plots (I) and plots treated with fungicide (IF) for DON content, FHB disease severity (I, no symptoms visible) and relative yield reduction (% to uninfected control) in 2007-2009 experiments at two locations

Variety group	DON (ppm)		FHB (1-9)		Relative yield (%)	
	IF	I	IF	I	IF	I
R	0,52	0,92	0,8	1,4	100	97
M	1,62	2,60	2,0	2,6	98	92
S	3,67	7,82	3,3	4,5	101	87

Molecular markers are now available for many traits. Their high costs still restrict their use in middle sized companies like Selgen. Therefore, close cooperations with research institutes like Research Institute of Crop Production in Prague-Ruzyně for the development of gene maps, molecular markers, primers, methods, training and consultations of specialists working in breeding, pre-breeding and development of new sources, including transgenic sources is important.

MAS will remain laboratory-based breeding, an indirect method, which must be confirmed by conventional tests. It is necessary to test breeding lines in interactions with climates, environments, under different biotic and abiotic stresses and to test end-use quality. KOEBNER and SUMMERS (2003) mentioned that MAS should remain servant of the field breeder and not its master. Wheat breeding will continue to be driven primarily by selection in breeder's plots rather than by detection in laboratory plates.

### Acknowledgements

The authors express thanks to L. Slámová and P. Vejl (CZU) for the detection of resistance genes by molecular markers and M. Vlčková and Š. Bártová for technical assistance. The work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, project NAZV QG 50073 and QH81293.

### References

- BARTOŠ P, ŠÍP V, CHRPOVÁ J, VACKE J, STUHLÍKOVÁ E, BLAŽKOVÁ V, ŠÁROVÁ H, HANZALOVÁ A, 2002: Achievement and prospects of wheat breeding for disease resistance. *Czech J Genet Plant Breed* 38, 16-28.
- CHEN J, GRIFFEY CA, SAGHAI MAROOF MA, WILSON JA, NABATI D, BIYASHEV RM, 2003: Molecular mapping and marker assisted selection of QTLs for Fusarium head blight resistance in Chinese wheat line W14. In: Canty SM, Lewis J, Ward RW (comp.), 2003 National Fusarium Head Blight Forum Proceedings, 13-15 Dec, Bloomington, MN, pp 7-10. US Wheat & Barley Scab Initiative, Michigan State Univ.
- HANIŠOVÁ A, KUBÁNEK J, ŽŮRKOVÁ D, 1993: Screening for eyespot resistance (*Pseudocercospora herpotrichoides*) in the winter wheat breeding programme. *Polnohospodárstvo* 39, 808-812.
- KNAPP SJ, 1998: Marker-assisted selection as a strategy for increasing the probability of selection superior genotypes. *Crop Sci* 38, 1164-1174.
- KOEBNER RMD, SUMMERS RW, 2003: 21<sup>st</sup> century wheat breeding: plot selection or plate selection? *Trends Biotechnol* 21, 59-63.
- KUBÁNEK J, HANIŠOVÁ A, HORČIČKA P, 1999: The use of mixed samples for analyses of HMW glutenin subunits in wheat breeding. *Czech J Genet Plant Breed* 35, 11-16.
- PAYNE PI, LAWRENCE GJ, 1983: Catalogue of alleles for the complex loci, *Glu-A1*, *Glu B1*, and *Glu D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res Commun* 11, 29-35.
- ŠAŠEK A, ČERNÝ J, HANIŠOVÁ A, 1982: Využití gliadinových signálních genů ve šlechtění pšenice. *Genetika a Šlechtění* 18, 241-255.
- ŠAŠEK A, ČERNÝ J, HANIŠOVÁ A, 1984: Gliadinové bloky - markery mrazuvzdornosti u pšenice obecné. *Genetika a Šlechtění* 20, 199-206.
- VEŠKRNA O, CHRPOVÁ J, ŠÍP V, SEDLÁČEK T, HORČIČKA P, 2009: Response of wheat varieties to the infection with barley yellow dwarf virus and prospects for resistance breeding. *Czech J Genet Plant Breed* 45, 45-56.

## Application of molecular markers in breeding for leaf rust resistance in wheat

Gyula Vida<sup>1\*</sup>, Mariann Gál<sup>1</sup>, Andrea Uhrin<sup>1</sup>, Ottó Veisz<sup>1</sup>,  
Zhulin Wang<sup>2</sup>, Tibor Kiss<sup>1</sup>, Ildikó Karsai<sup>1</sup> and Zoltán Bedő<sup>1</sup>

### Abstract

The breeding and cultivation of resistant wheat varieties is an effective way of controlling leaf rust. The use of molecular markers facilitates the incorporation of the major leaf rust resistance genes (*Lr* genes) responsible for resistance into new varieties and the pyramiding of these genes. Marker assisted selection was used to incorporate the currently effective *Lr* genes in Hungary (*Lr9*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr29*, *Lr35* and *Lr37*) into winter wheat varieties. The *Lr* genes were identified using STS, SCAR and RAPD markers closely linked to them. Investigations were made on how these markers could be utilised in plant breeding, and near-isogenic lines resembling the recurrent variety but each containing a different *Lr* gene were developed to form the initial stock for the pyramiding of resistance genes or creating multiline varieties. Molecular markers are also ideal for the identification of resistance genes in wheat genotypes with unknown genetic background. The presence of *Lr1*, *Lr10*, *Lr26*, *Lr34* and *Lr37* resistance genes has been demonstrated using molecular markers in the Martonvásár gene pool.

### Keywords

Marker assisted selection, *Puccinia triticina*, pyramiding of genes, resistance breeding, *Triticum aestivum*

### Introduction

Improving resistance to rust fungi is one of the major tasks facing wheat breeders all over the world. Wheat is attacked by three rust species: leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.), stem rust (*P. graminis* Pers.: Pers. f. sp. *graminis* Eriks. & E. Henn) and stripe (yellow) rust (*P. striiformis* Westend.). All three pathogens are capable of causing substantial economic losses, but their incidence varies due to their diverse ecological requirements. In Hungary the greatest damage is currently caused by leaf rust, which can be expected to infect wheat fields every year. During the first half of the 20<sup>th</sup> century it was not thought to be of economic importance (HUSZ 1941), but since then it has been shown that under Hungarian conditions leaf rust may cause yield losses of up to 40% (BARABÁS and MATUZ 1983).

The most environmentally sound, low cost method of controlling leaf rust is to breed and grow resistant wheat varieties. So far over 60 leaf rust resistance genes, i.e. *Lr*

genes, have been identified and localised on the wheat chromosomes. In addition, a number of temporarily designated resistance genes and quantitative loci (QTLs) are able to provide total or partial protection against various rust pathotypes (MCINTOSH et al. 2008). The effectiveness of resistance genes depends on the composition of the pathogen population. As this changes dynamically, new pathotypes virulent to the given resistance gene multiply from time to time, so the resistance of a variety is not a constant trait. Any variety carrying a single resistance gene may become susceptible within a short time. The postulation of resistance genes is traditionally carried out using rust isolates with known virulence (KNOTT 1989), but this procedure is extremely time-, space- and labour-intensive and cannot be employed if no differential fungal isolate is available. In many cases resistance genes can only be identified using molecular markers (MELCHINGER 1990). Over the last 15 years many efficient markers for leaf rust resistance genes have been described. The molecular markers most closely linked to *Lr* genes are listed in Table 1. The table only contains markers based on the PCR technique, as the majority of these can be applied relatively easily in wheat breeding programmes.

Molecular markers are used for two purposes in resistance breeding: (1) to monitor the incorporation of designated resistance genes or QTLs into elite wheat genotypes (i.e. MAS, marker assisted selection), (2) to identify resistance genes in varieties and lines where the genetic background is unknown (i.e. gene detection). The Martonvásár wheat breeding programme makes use of molecular markers linked to leaf rust resistance genes for both of these purposes. Therefore, a backcross programme based on markers has been initiated to incorporate *Lr* genes that are currently effective in Hungary into Martonvásár wheat varieties, while the presence of *Lr* genes in the wheat varieties and lines bred in Martonvásár or used as parental partners in the breeding programme is also investigated.

### Materials and methods

#### *Marker assisted selection and identification of designated leaf rust resistance genes*

A backcross (BC) programme was started in the Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences

<sup>1</sup> Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Brunszvik u. 2, 2462 MARTONVÁSÁR, Hungary

<sup>2</sup> Northwest A & F University, 712100 YANGLING, Shaanxi, P.R. China

\* Ansprechpartner: Dr. Gyula VIDA, vidagy@mail.mgki.hu

**Table 1: Molecular markers used for marker assisted selection of leaf rust resistance genes**

<i>Lr</i> gene	Marker type <sup>1</sup>	Linkage <sup>2</sup>	Name of the marker	Reference
<i>Lr1</i>	RGA	flank	Lr1RGA1	QIU et al. 2007
<i>Lr3</i>	cDNA	func	TaR16	DANNA et al. 2002
<i>Lr9</i>	SCAR	flank	SCS5550	GUPTA et al. 2005
<i>Lr10</i>	Functional	func	T10Rga1	FEUILLET et al. 2003
<i>Lr13</i>	SSR	flank	barc163-2B	BANSAL et al. 2008
<i>Lr14</i>	SSR	dist10	gwm344	HERRERA-FOESSEL et al. 2007
<i>Lr16</i>	SSR	flank	wmc764	MCCARTNEY et al. 2005
<i>Lr19</i>	STS	flank	GBF/GBR	PRINS et al. 2001
<i>Lr20</i>	STS	flank	STS638	KHAN et al. 2005
<i>Lr21</i>	Functional	func	Lr1L/Lr21R	HUANG and GILL 2001
<i>Lr22a</i>	SSR	flank	gwm455	HIEBERT et al. 2007
<i>Lr24</i>	SCAR	flank	SCS73719	PRABHU et al. 2004
<i>Lr25</i>	SCAR	flank	Lr25F20/Lr25R19	PROCUNIER 2009
<i>Lr26</i>	PCR-based	flank	P6M12-P	MAGO et al. 2005
<i>Lr28</i>	SCAR	flank	SCS421570	CHERUKURI et al. 2005
<i>Lr29</i>	SCAR	flank	Lr29F18/Lr29R18	PROCUNIER 2009
<i>Lr34</i>	STS	flank	csLV34	LAGUDAH et al. 2006
<i>Lr35</i>	STS, SCAR	flank	SR39 F2/R3, BCD260F1/35R2	GOLD et al. 2002 SEYFARTH et al. 1999
<i>Lr37</i>	SCAR, CAPS	flank	SC-Y15F/SC-Y15R VENTRIUP/LN2	ROBERT et al. 1999 HELGUERA et al. 2003
<i>Lr38</i>	SSR	flank	wmc773	MEBRATE et al. 2008
<i>Lr39</i>	SSR	dist10	gwm210	RAUPP et al. 2001
<i>Lr46</i>	STS	flank	XSTS1BL2/XSTS1BL9	MATEOS-HERNANDEZ et al. 2006
<i>Lr47</i>	CAPS	flank	PS10R/PS10L	HELGUERA et al. 2000
<i>Lr48</i>	SSR	flank	gwm429b	BANSAL et al. 2008
<i>Lr49</i>	SSR	flank	barc163	BANSAL et al. 2008
<i>Lr50</i>	SSR	flank	gwm382	BROWN-GUERDIRA et al. 2003
<i>Lr51</i>	CAPS	flank	S30-13L/AGA7-759R	HELGUERA et al. 2005
<i>Lr52</i>	STS	flank	txw200	TAR et al. 2008
<i>Lr58</i>	SSR	flank	cfid50	KURAPARTHY et al. 2007
<i>Lr60</i>	SSR	flank	barc149	HIEBERT et al. 2008
<i>Lr63</i>	SSR	flank	barc321	KOLMER 2008
<i>Lr64</i>	SSR	dist10	barc104	KOLMER 2008

<sup>1</sup> CAPS, cleaved amplified polymorphic sequence; RGA, resistance gene analogue; SCAR, sequence characterized amplified region; SSR, simple sequence repeat; STS, sequence-tagged site

<sup>2</sup> dist10, distance between marker and gene >10cM; flank, flanking marker; func, functional marker

aimed at the transfer of effective *Lr* genes. Martonvásár winter wheat varieties with good agronomic and technological quality parameters, but susceptible or moderately resistant to leaf rust (Mv Emma, Mv Madrigál, Mv Pálma and Mv Magvas) were crossed with near-isogenic lines of Thatcher each carrying a different *Lr* gene [*Lr9*: Thatcher\*6 (R.L.6010); *Lr24*: Thatcher\*6/Agent; *Lr25*: Thatcher\*6/Transec; *Lr29*: Thatcher\*6/Cs7D-Ag#11; *Lr35*: Thatcher\*6/R.L.5711] and with Renan (*Lr37*). The F<sub>1</sub> plants were backcrossed to the recurrent parents. BC<sub>1</sub> plants were selected by means of MAS from different backcross generations and these were again backcrossed with the recurrent parent.

The choice of *Lr* genes for incorporation was based not only on their effectiveness, but also on whether reliable,

closely linked PCR markers were available. These were used for MAS in backcross (BC) generations segregating for the *Lr* genes. The CTAB (cetyl-trimethyl-ammonium bromide) method (ROGERS and BENDICH 1985) and the DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen®) were used to isolate DNA. In each combination 10-15 plants were tested for leaf rust resistance in the greenhouse and field. In the seedling stage, the leaf rust resistance of the young plants was tested in the greenhouse parallel with the isolation of DNA, in order to monitor the efficiency.

The plants were inoculated in the 2-leaf stage with a mixture of leaf rust uredospores collected from varieties with various genetic backgrounds and multiplied in the greenhouse. PCR-based primers were used for the detection of the *Lr* genes (Table 2).

**Table 2: DNA markers used for marker assisted selection**

<i>Lr</i> gene	Marker	Marker type	Size of amplified product (bp)	References
<i>Lr9</i>	J13/1, J13/2	STS	1100	SCHACHERMAYR et al. 1994
<i>Lr24</i>	SC-H5/1, SC-H5/2	SCAR	700	DEDRYVER et al. 1996
<i>Lr25</i>	LR25F20, Lr25R19	SCAR	1800	PROCUNIER 2009
<i>Lr29</i>	UBC219	RAPD	1000	PROCUNIER et al. 1995
<i>Lr35</i>	BCD260F1/35R2	STS	900	SEYFARTH et al. 1999
<i>Lr37</i>	SC-Y15 F/R	SCAR	580	ROBERT ET AL. 1999

The PCR reactions were carried out as proposed by the authors cited in *Table 2*, after which the products were amplified using PTC-100 (MJ Research) and GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) equipment. The amplified products were visible under UV light after electrophoresis on 1.2% agarose gels containing ethidium bromide. The presence of five leaf rust resistance genes (*Lr1*, *Lr10*, *Lr26*, *Lr34* and *Lr37*) was analysed in the Martonvásár wheat pool. Molecular markers *WR003* for *Lr1* (QIU et al. 2007), *ThLr10* for *Lr10* (FEUILLET et al. 2003), *IAG95* for *Lr26* (MOHLER et al. 2001), *csLV34* for *Lr34* (LAGUDAH et al. 2006) and *SC-Y15* for *Lr37* (ROBERT et al. 1999) were applied using the published PCR protocols.

### Field tests

The field leaf rust resistance of the plants (36 Thatcher-based near-isogenic lines, 4 recurrent parents, donor parents, BC plants, control: Thatcher) was evaluated in an artificially inoculated nursery. Rows of a spreader variety, planted around the tested genotypes, were inoculated in development stage 37-39 on the Zadoks scale (ZADOKS et al. 1974) using the uredospore mixture also used in the greenhouse experiments. The spore suspension was injected into the spreader plants using a hyperdermic syringe. The pathogen then spread naturally from these primary sources of infection. The extent of infection at development stage 77-83 was evaluated in terms of severity (according to the modified Cobb scale; STUBBS et al. 1986) and host response (resistant, moderately resistant, intermediate, moderately susceptible and susceptible). The average coefficient of infection (ACI) was calculated from these two data by multiplying severity by an assigned constant value for the host response, for use in the statistical evaluation (STUBBS et al. 1986).

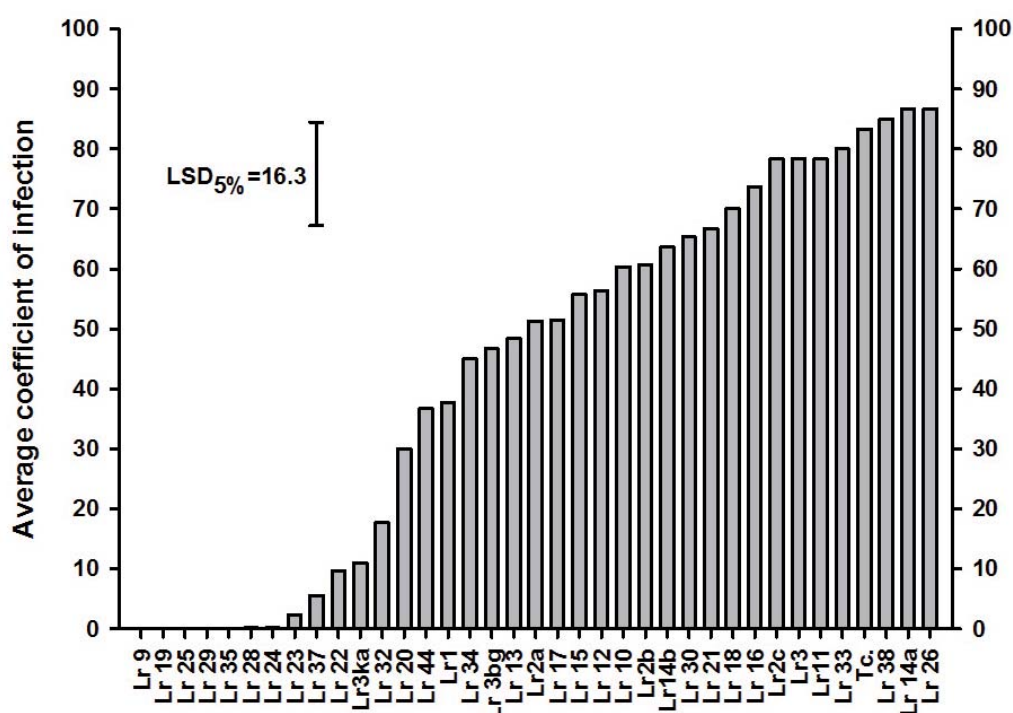
### Dihaploid programme

The anther cultures were initiated from greenhouse-grown materials. Anthers in the mid-uninucleate stage were cultured on liquid MN6 induction medium (CHU et al. 1990). The cultures were kept in the dark at 29°C for 30 days, after which the embryogenic structures were transferred to 190-2 regeneration medium containing 0.09 M sucrose (ZHUANG and JIA 1983). Plant regeneration took place at 26°C with a 16-h light, 8-h dark photoperiod regime. Green plantlets were transferred to individual test tubes containing hormone-free 190-2 regeneration medium with 0.03 M sucrose and were vernalized for six weeks. Colchicine treatment took place after the vernalization treatment in the test tubes, after which the plants were planted into soil and grown till maturity.

## Results

### Effectiveness of leaf rust resistance genes in Martonvásár

The field resistance of wheat genotypes carrying designated *Lr* genes has been tested for several decades in order to determine the efficiency of major leaf rust resistance genes. Each year Thatcher-based near-isogenic lines (NILs), each carrying a different resistance gene or allele, are sown in the experiments. The mean ACI values calculated from leaf rust infection data recorded in the artificially inoculated nursery in Martonvásár over the last seven years are presented in *Figure 1*. The results indicate that seven of the NILs carrying a single *Lr* gene or allele are still not infected by the pathogen or only to a negligible extent. Wheat lines carrying *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29* and *Lr35* had excellent



*Figure 1*: Leaf rust infection of near-isogenic lines of Thatcher (Martonvásár, 2004-2009)

resistance. In 2009 we detected moderately susceptible reaction (30-40MS) on wheat genotypes carrying *Lr37* in their genetic background, there was no sign of infection on them earlier. The line exhibiting the greatest degree of infection was the NIL carrying *Lr26*.

### Marker assisted selection and gene pyramiding

The agronomic traits of Thatcher NILs are not adapted to Hungarian conditions, but in most cases these are the only source of resistance genes. The phenotype of the French variety Renan, which carries gene *Lr37*, is more similar to that of Hungarian varieties. A marker assisted backcross programme was set up to incorporate leaf rust resistance genes into four Martonvásár varieties (Mv Emma, Mv Madrigál, Mv Magvas, Mv Pálma). Combinations between Martonvásár wheat varieties and resistance sources carrying single *Lr* genes were first created for genes *Lr9*, *Lr24*, *Lr25* and *Lr29*, after which the programme was expanded to include two genes conferring adult plant resistance (*Lr35* and *Lr37*). All selected *Lr* genes provide an excellent level of resistance to the Hungarian leaf rust population, while the recurrent parents chosen have good agronomic and quality traits. Mv Pálma, Mv Emma and Mv Madrigál are susceptible to the pathogen, while Mv Magvas is moderately resistant.

After the PCR reaction conditions were optimised, all primers worked. This way MAS could be made in the segregating generations. Until now lines in the BC<sub>2</sub>-BC<sub>6</sub> generation have been developed for various crosses (Table 3). The agronomic traits of BC<sub>5</sub> and BC<sub>6</sub> lines are very similar to those of the Martonvásár parent. As the linkage of the markers to the resistance genes is not complete, MAS of *Lr* genes was complemented in each case by phenotypic analysis. Only plants that were resistant to leaf rust and were found to carry the relevant resistance gene were used to create the next backcross generation.

Since the use of *Lr* genes singly increases the danger of genetic vulnerability, combinations of lines carrying different genes were developed in order to pyramid the genes. The aim was to create genotypes carrying several resistance genes simultaneously, in the hope that these would have more durable resistance to leaf rust than those carrying a single gene. To date, different gene combinations have been developed for the four Martonvásár varieties. A doubled haploid (DH) programme has been set up based on anther culture in order to stabilise the gene combinations. The raising of DH plants is now underway for most of the combinations. So far, plants carrying two *Lr* genes in a stable condition have been identified for three combinations (Mv Emma *Lr9+Lr24*, Mv Pálma *Lr9+Lr24* and Mv Pálma *Lr9+Lr29*).

### Identification of designated leaf rust resistance genes using molecular markers

The second field in which molecular markers are used in wheat resistance breeding is the determination of designated resistance genes in genotypes where the genetic background has not yet been clarified. The presence of a number of genes is currently being analysed in wheat varieties and breeding lines bred in Martonvásár or used as parents in the breeding programme. Tests have been carried out for the presence of a total of 10 *Lr* genes (*Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr34*, *Lr35* and *Lr37*) in the breeding material, but so far only five genes have been found to be present.

#### *Lr1*

In hexaploid wheat *Lr1* is located at the distal end of the long arm of chromosome 5D. This gene was the first designated *Lr* gene and can still be found in many wheat varieties all over the world (MCINTOSH et al. 2008). *Lr1* is one of the sequenced resistance genes, this way a functional marker is available for detection (QIU et al. 2007). Among 74 Martonvásár wheat varieties released since the beginning of the wheat breeding programme 11 carry the *Lr1* resistance gene (Martonvásári 17, Mv Irma, Mv Madrigál, Mv Matador, Mv Summa, Mv Magvas, Mv Mezőföld, Mv Tamara, Mv Mazurka, Mv Hombár and Mv Laura).

#### *Lr10*

The *Lr10* gene originates from bread wheat and is located on chromosome arm 1AS. *Lr10* is the first cloned resistance gene in wheat, according to literature it has a CC-NBS-LRR structure. Functional markers were designed to identify this resistance gene in the wheat genome (FEUILLET et al. 2003). *Lr10* can be found in many wheat varieties with different geographical origin. In released Martonvásár varieties we could find it in 15 of them (Martonvásári 13, Mv Matador, Mv Martina, Mv Kucsma, Mv Emese, Mv Palotás, Mv Prizma, Mv Matild, Mv Mambo, Mv Béres, Mv Garmada, Mv Hombár, Mv Gorsium, Mv Kemence and Mv Laura).

#### *Lr26*

Earlier results (KŐSZEGI et al. 2000) showed that *Lr26*, located on the 1BL.1RS translocation, was frequently found in Martonvásár varieties. This was confirmed by recent results for 59 Martonvásár varieties, 36 of which contain the 1BL.1RS translocation (61%). However, *Lr26* was detected at different frequencies in varieties registered before and after 2000. The 1BL.1RS translocation was present in 77.1% of the 35 older varieties, while this figure dropped to 37.5% in the 24 most recently registered genotypes. The

Table 3: Progenies developed in the backcross programme (Martonvásár, 2009)

Variety	<i>Lr9</i>	<i>Lr24</i>	<i>Lr25</i>	<i>Lr29</i>	<i>Lr35</i>	<i>Lr37</i>
Mv Emma	BC <sub>6</sub>	BC <sub>6</sub>	BC <sub>6</sub>	BC <sub>6</sub>	BC <sub>4</sub>	BC <sub>4</sub>
Mv Madrigál	BC <sub>6</sub>	BC <sub>6</sub>	BC <sub>6</sub>	BC <sub>4</sub>	BC <sub>5</sub>	BC <sub>5</sub>
Mv Magvas	BC <sub>6</sub>	BC <sub>4</sub>	BC <sub>5</sub>	BC <sub>6</sub>	BC <sub>5</sub>	BC <sub>4</sub>
Mv Pálma	BC <sub>6</sub>	BC <sub>5</sub>	BC <sub>5</sub>	BC <sub>6</sub>	BC <sub>5</sub>	BC <sub>2</sub>

1BL.1RS translocation is also found in a large number of the varieties of non-Martónvásár origin used in the breeding programme, being detected in 53.4% of the wheat varieties and breeding lines examined.

#### *Lr34*

Pedigree analysis of Martónvásár varieties demonstrated that Bezostaya 1, or its ancestor Bezostaya 4, was present in the pedigree of almost all varieties. In addition to registered Martónvásár varieties, a number of Martónvásár breeding lines were tested, along with crossing partners of other origin. *Lr34* was found in 64 of 226 wheat varieties and lines examined (28.3%). The gene was detected in 34 of 128 varieties and lines of Martónvásár origin (26.6%), but the molecular marker identified the gene in only twelve of 73 registered varieties tested (Martónvásári 3, Martónvásári 13, Martónvásári 17, Mv Emese, Mv Garmada, Mv Gorsium, Mv Laura, Mv Mambó, Mv Pálma, Mv Palotás, Mv Táltos and Mv Vilma).

#### *Lr37*

Varieties of Western European origin are also used as parents in the Martónvásár crossing programme. Over the last few decades many varieties carrying *Lr37* have been bred in Western Europe, so it was expected that the genome of the foreign crossing partners and of some of the Martónvásár wheat varieties and lines might contain this gene. The results of the PCR amplifications indicated its presence in Western European, North American and Eastern European cultivars and lines. Most of the lines carrying *Lr37* originated from Switzerland, but it was also identified in French varieties, in three lines bred in the USA, in one breeding line from Serbia and in one Austrian variety. The analysis also showed the presence of the gene in the Martónvásár breeding material. Among the registered varieties Mv Vekni carries this leaf rust resistance gene and it has also been detected in several breeding lines.

## Discussion

Although major resistance genes have many disadvantages (AYLIFFE et al. 2008), they are still widely used in wheat resistance breeding. In recent years developments in molecular marker techniques and marker identification have facilitated the spread of MAS. This is particularly true in the field of breeding wheat for leaf rust resistance, where PCR-based markers are already available for almost half of the 60 or more designated resistance genes and alleles. Furthermore, all the effective resistance genes designated so far can be traced in segregating progeny populations by means of MAS.

Experiments carried out in an artificially inoculated field nursery indicated that several *Lr* genes still provide complete or excellent protection against this pathogen in Hungary. The incorporation of six of these genes into Martónvásár wheat varieties is now in progress. The aim is to develop sources adapted to Hungarian conditions, with far better agronomic traits than the original donor varieties. NILs developed from the same recurrent variety and each carrying a different *Lr* gene can be crossed with each other to pyramid resistance genes at the genotype level (NELSON 1978) which could

result in better resistance if 'undefeated' resistance genes are introgressed into a single plant genotype (PINK 2002). Alternatively, multiline varieties can be produced from a mixture of lines (BROWNING and FREY 1969). The multiline concept can be further refined using the 'mix and match' approach (PINK and PUDDEPHAT 1999), in which the line population forming the multiline variety is compiled on the basis of matching virulence. The aim of the programme cannot be to use lines containing a single resistance gene as varieties. Matching virulence has now been identified for almost all *Lr* genes in all wheat-growing areas of the world (MCINTOSH et al. 1995), so if any line carrying a resistance gene that is still effective today were to be grown on a larger area, virulent pathotypes would soon multiply in the pathogen population.

The presence of *Lr1* and *Lr10* genes were assumed in the Martónvásár gene pool, but this was the first time we could prove it using molecular markers. During investigations to detect designated resistance genes, a reduction in the proportion of varieties carrying the *Lr26* resistance gene was noted among wheat varieties registered in recent years. This process has accelerated, primarily due to the greater value attached to technological quality traits. Varieties carrying the 1B/1R translocation have poorer bread-making quality due to the presence of storage proteins of the secalin type (DHALIWAL et al. 1987). As expected *Lr34* was found in many Martónvásár varieties. Although this gene alone is capable of reducing the level of infection to almost half, as reported by SINGH and RAJARAM (2002) and confirmed in the present work, resistance that is both excellent and durable can only be achieved if *Lr34* is combined with 2 or 3 other genes (SINGH and RAJARAM 1992). *Lr37* can be detected at high frequency in Western European wheat varieties. This is not the result of targeted resistance breeding against leaf rust, as this pathogen rarely causes serious economic losses in countries with a cool maritime climate. Another rust species, stripe rust, however, often causes damage to wheat fields. *Lr37* originated from *Aegilops ventricosa* and the chromosome segment that became translocated into the wheat genome also carries the *Yr17* resistance gene for yellow rust. This gene was successfully used by Western European breeders to fight the pathogen for a number of years, but it has now lost its effectiveness (BAYLES et al. 2000). Unfortunately, pathotypes virulent to *Lr37* have also appeared (ROBERT et al. 2000) and the virulence was also observed in Martónvásár during the 2008/2009 wheat season.

Experience gained so far suggests that markers flanking *Lr* genes can be used simply and effectively in marker assisted backcross programmes. Nevertheless, as the linkage between markers and resistance genes is not complete, regular phenotypic monitoring will be required if satisfactory parental genotypes are to be selected. According to our earlier results (GÁL et al. 2007) the ratio of false positive plants for the genes *Lr9*, *Lr24*, *Lr25* and *Lr29* was 1.3, 4.0, 9.5 and 7.6%, respectively. However, molecular markers can prove the presence of the requested resistance gene in the genetic background and in the case of plants carrying adult plant resistance genes - like *Lr35* and *Lr37* - this is the only way to choose appropriate parents for crossing programme. The

use of MAS, whereby breeders select for molecular markers linked to *Lr* genes, enables the pyramiding of more than one effective resistance gene. With the help of molecular markers, resistance genes are easy to detect in wheat varieties of unknown parentage. This information can then be used to design crossing programmes.

## Acknowledgements

This research was funded in part by the BioExploit (FOOD-CT-2005-513959) FP6 project and by the NAP\_BIO\_06 'Plantresource' project (NKTH).

## References

- AYLIFFE M, SINGH R, LAGUDAHE, 2008: Durable resistance to wheat stem rust needed. *Curr Opin Plant Biol* 11, 187-192.
- BANSAL UK, HAYDEN MJ, VENKATA BP, KHANNA R, SAINI RG, BARIANA HS, 2008: Genetic mapping of adult plant leaf rust resistance genes *Lr48* and *Lr49* in common wheat. *Theor Appl Genet* 117, 307-312.
- BARABÁS Z, MATUZ J, 1983: A levélrozsdá és a lisztharthat epidémia, illetve különféle rezisztencia típusok befolyása őszi búza genotípusok termésére (Yield of winter wheat genotypes as affected by leaf rust and powdery mildew epidemics as well as by the type of resistance). *Növénytermelés* 32, 193-207.
- BAYLES RA, FLATH K, HOVMØLLER MS, DE VALLAVIEILLE-POPE C, 2000: Breakdown of the *Yr17* resistance to yellow rust of wheat in northern Europe. *Agronomie* 20, 805-811.
- BROWN-GUERDIRA GL, SINGH S, FRITZ AK, 2003: Performance and mapping of leaf rust resistance to wheat from *Triticum timopheevii* subsp. *armeniicum*. *Phytopathology* 93, 784-789.
- BROWNING JA, FREY KJ, 1969: Multiline cultivars as a means of disease control. *Ann Rev Phytopathol* 7, 355-382.
- CHERUKURI DP, GUPTA PK, CHARPE A, KOUL S, PRABHU KV, SINGH RB, HAQ QMR, 2005: Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. *Euphytica* 143, 19-26.
- CHU CC, HILL RD, BRULE-BABEL AL, 1990: High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. *Plant Sci* 66, 255-262.
- DANNA CH, SACCO F, INGALA LR, SAIONE HA, UGALDE RA, 2002: Cloning and mapping of genes involved in wheat-leaf rust interaction through gene-expression analysis using chromosome-deleted near-isogenic wheat lines. *Theor Appl Genet* 105, 972-979.
- DEDRYVER F, JUBIER MF, THOUVENIN J, GOYEAU H, 1996: Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr24* in different wheat cultivars. *Genome* 39, 830-835.
- DHALIWAL AS, MARES DJ, MARSHALL DR, 1987: Effect of 1B/1R chromosome translocation on milling and quality characteristics of bread wheats. *Cereal Chem* 64, 72-76.
- FEUILLET C, TRAVELLA S, STEIN N, ALBAR L, NUBLAT A, KELLER B, 2003: Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15253-15258.
- GÁL M, VIDA G, UHRINA, BEDŐ Z, VEISZ O, 2007: Incorporation of leaf rust resistance genes into winter wheat genotypes using marker-assisted selection. *Acta Agron Hung* 55, 149-156.
- GOLD J, HARDER D, TOWNLEY-SMITH F, AUNG T, PROCUNIER JD, 2002: Development of molecular marker for rust resistance genes *Sr39* and *Lr35* in wheat breeding lines. *Electronic J Biotechnol* 2, 35-40.
- GUPTA SK, CHARPE A, KOUL S, PRABHU KV, HAQ QM, 2005: Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf-rust-resistance gene, *Lr9*, for marker-assisted selection in bread wheat. *Genome* 48, 823-830.
- HELGUERA M, KHAN IA, DUBCOVSKY J, 2000: Development of PCR markers for the wheat leaf rust resistance gene *Lr47*. *Theor Appl Genet* 100, 1137-1143.
- HELGUERA M, KHAN IA, KOLMER J, LIJAVETZKY D, ZHONG-QI L, DUBCOVSKY J, 2003: PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Sci* 43, 1839-1847.
- HELGUERA M, VANZETTI L, SORIA M, KHAN IA, KOLMER J, DUBCOVSKY J, 2005: PCR markers for *Triticum speltoides* leaf rust resistance gene *Lr51* and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Sci* 45, 728-734.
- HERRERA-FOESSEL SA, SINGH RP, HUERTA-ESPINO J, WILLIAM HM, GARCIA V, DJURLE A, YUEN J, 2007: Identification and molecular characterization of leaf rust resistance gene *Lr14a* in durum wheat. *Plant Dis* 92, 469-473.
- HIEBERT CW, THOMAS JB, MCCALLUM BD, SOMERS DJ, 2008: Genetic mapping of the wheat leaf rust resistance gene *Lr60* (*LrW2*). *Crop Sci* 48, 1020-1026.
- HIEBERT CW, THOMAS JB, SOMERS DJ, MCCALLUM B, FOX S, 2007: Microsatellite mapping of adult-plant resistance gene *Lr22a* in wheat. *Theor Appl Genet* 115, 877-884.
- HUANG L, GILL BS, 2001: An RGA-like marker detects all known *Lr21* leaf rust resistance gene family members in *Aegilops tauschii* and wheat. *Theor Appl Genet* 103, 1007-1013.
- HUSZ B, 1941: A beteg növény és gyógyítása (The diseased plant and its healing). Királyi Magyar Természettudományi Társulat, Budapest.
- KHAN RR, BARIANA HS, DHOLAKIA BB, NAIK SV, LAGU MD, RATHJEN AJ, BHAVANI S, GUPTA VS, 2005: Molecular mapping of stem and leaf rust resistance in wheat. *Theor Appl Genet* 111, 846-850.
- KOLMER J, 2008: *Lr63*, *Lr64*. Cited in: McIntosh RA, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris C, Appels R, Xia XC (eds), Catalogue of gene symbols for wheat: 2009 supplement, p 271 (Reference 10550, p 273). *Ann Wheat Newsl* 55, 256-278.
- KNOTT DR, 1989: The wheat rusts: breeding for resistance. Springer-Verlag, Berlin.
- KÖSZEGIB, LINC G, JUHÁSZ L, LÁNG L, MOLNÁR-LÁNG M, 2000: Occurrence of the 1RS/1BL wheat-rye translocation in Hungarian wheat varieties. *Acta Agr Hung* 48, 27-236.
- KURAPARTHY V, SOOD S, CHHUNEJA P, DHALIWAL HS, KAUR S, BOWDEN RL, GILL BS, 2007: A cryptic wheat-*Aegilops triuncialis* translocation with leaf rust resistance gene *Lr58*. *Crop Sci* 47, 1995-2003.
- LAGUDAHES, MCFADDEN H, SINGH RP, HUERTA-ESPINO J, BARIANA HS, SPIELMEYER W, 2006: Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor Appl Genet* 114, 21-30.
- 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.
- MATEOS-HERNANDEZ M, SINGH R, HULBERT SH, BOWDEN RL, HUERTA-ESPINO J, GILL BS, BROWN-GUERDIRA G, 2006: Targeted mapping of ESTs linked to the adult plant resistance gene *Lr46* in wheat using synteny with rice. *Funct Integr Genomics* 6, 122-131.



- MCCARTNEY CA, SOMERS DJ, MCCALLUM BD, THOMAS J, HUMPHREYS DG, MENZIES JG, BROWN PD, 2005: Microsatellite tagging of the leaf rust resistance gene *Lr16* on wheat chromosome 2BSc. *Mol Breed* 15, 329-337.
- MCINTOSH RA, WELLINGS CR, PARK RF, 1995: Wheat rusts - an atlas of resistance genes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- MCINTOSH RA, YAMAZAKI Y, DUBCOVSKY J, 2008: Catalogue of gene symbols for wheat. In: Komugi - Integrated wheat science database [Available online: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>; accessed 22 Nov 2009].
- MEBRATE SA, OERKE EC, DEHNE HW, PILLEN K, 2008: Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr38* on wheat chromosome arm 6DL using SSR markers. *Euphytica* 162, 457-466.
- MELCHINGER AE, 1990: Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breed* 104, 1-19.
- MOHLER V, HSAM SLK, ZELLER FJ, WENZEL G, 2001: An STS marker distinguishing the rye-derived powdery mildew resistance alleles at the *Pm8/Pm17* locus of common wheat. *Plant Breed* 120, 448-450.
- NELSON RR, 1978: Genetics of horizontal resistance to plant diseases. *Ann Rev Phytopathol* 16, 359-378.
- PINK DAC, 2002: Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica* 124, 227-236.
- PINK D, PUDDEPHAT I, 1999: Deployment of disease resistance genes by plant transformation - a 'mix and match' approach. *Trends Plant Sci* 4, 71-75.
- PRABHU KV, GUPTA SK, CHARPE A, KOUL S, 2004: SCAR marker tagged to the alien leaf rust resistance gene *Lr19* uniquely marking the *Agropyron elongatum* gene *Lr24* in wheat: a revision. *Plant Breed* 123, 417-420.
- PRINS R, GROENEWALD JZ, MARAIS GF, SNAPE JW, KOEBNER RMD, 2001: AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. *Theor Appl Genet* 103, 618-624.
- PROCUNIER JD, 2009: Disease resistance. Leaf Rust Resistance *Lr29-Lr25*. Wheat CAP [Available online: <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr29/index.htm>; accessed 22 Nov 2009].
- PROCUNIER JD, TOWNELY-SMITH TF, FOX S, PRASHAR S, GRAY M, KIM WK, CZARNECKI E, DYCK PL, 1995: PCR-based RAPD/DGGE markers linked to leaf rust resistance genes *Lr29* and *Lr25* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Genet Breed* 49, 87-92.
- QIU JW, SCHURCH AC, YAHIAOUI N, DONG LL, FAN HJ, ZHANG ZJ, KELLER B, LING HQ, 2007: Physical mapping and identification of a candidate for the leaf rust resistance gene *Lr1* of wheat. *Theor Appl Genet* 115, 159-168.
- RAUPP WJ, SUKHWINDER-SINGH, BROWN-GUERDIRA GL, GILL BS, 2001: Cytogenetic and molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr39* in wheat. *Theor Appl Genet* 102, 347-352.
- ROBERT O, ABELARD C, DEDRYVER F, 1999: Identification of molecular markers for the detection of the yellow rust resistance gene *Yr17* in wheat. *Mol Breed* 5, 167-175.
- ROBERT O, DEDRYVER F, ROLLAND B, ABELARD C, JAUDEAU B, 2000: Relationships between molecular identification of the gene *Yr17* and adult plant resistance against stripe and leaf rust in bread wheat varieties. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 35, 59-63.
- ROGERS OS, BENDICH JA, 1985: Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol* 5, 69-76.
- SCHACHERMAYR G, SIEDLER H, GALE DM, WINZELER H, WINZELER M, KELLER B, 1994: Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. *Theor Appl Genet* 88, 110-115.
- SEYFARTH R, FEUILLET C, SCHACHERMAYR G, WINZELER M, KELLER B, 1999: Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat. *Theor Appl Genet* 99, 554-560.
- SINGH RP, RAJARAM S, 1992: Genetics of adult-plant resistance to leaf rust in 'Frontana' and three CIMMYT wheats. *Genome* 35, 24-31.
- SINGH RP, RAJARAM S, 2002: Breeding for disease resistance in wheat. In: Curtis BC, Rajaram S, Gómez Macpherson H (eds), Bread wheat improvement and production, 252-270. FAO, Rome.
- STUBBS RW, PRESCOTT EE, SAARI EE, DUBIN HJ, 1986: Cereal disease methodology manual. CIMMYT, Mexico.
- TAR M, PURNHAUSER L, CSÖSZ M, 2008: Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr52* leaf rust resistance gene of wheat. *Cereal Res Commun* 36, 409-415.
- ZADOKS JC, CHANG TT, KONZAK CF, 1974: A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res* 14, 415-421.
- ZHUANG JJ, JIA X, 1983: Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: Hu H, Vega MR (eds), Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement, pp 431-432. Science Press, Beijing.

# Kartierung der Braunrostresistenz in einer Kreuzungspopulation aus Capo x Isengrain

## Mapping of leaf rust resistance in a Capo x Isengrain population

Lydia Matiasch<sup>1\*</sup>, Katharina Herzog<sup>1</sup>, Ján Kraic<sup>2</sup>, Valéria Šudyová<sup>2</sup>, Svetlana Šliková<sup>2</sup>,  
Franziska Löschenberger<sup>3</sup>, Marion Marn<sup>3</sup>, Julia Lafferty<sup>3</sup>, Maria Buerstmayr<sup>1</sup>, Hermann Buerstmayr<sup>1</sup>

### Abstract

The fungal disease leaf rust, caused by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, is occurring wherever wheat is grown. The best option to reduce yield losses due to earlier senescence of leaves is the cultivation of resistant varieties. Leaf rust resistance can be based upon one or more major genes (*Lr*-genes) and/or minor resistance genes acting quantitatively (quantitative trait loci, QTL). Capo is an Austrian winter wheat cultivar grown for 20 years with still low susceptibility to leaf rust. It seems to possess durable adult plant leaf rust resistance (APR). As this type of resistance can not be tested on seedling plants, molecular markers could facilitate early selection of new resistant varieties. 240 F<sub>6,7</sub> recombinant inbred lines (RILs) of the cross Capo x Isengrain have been tested over a period of 6 years on different locations. A QTL for leaf rust severity inherited from Isengrain could be detected at all experiments. Whether this is *Lr14a*, previously detected in seedling tests, needs further investigation, as Thatcher NILs with *Lr14a* were rather susceptible. One minor QTL inherited from Capo could only be detected in a few experiments. We could prove that *Lr34*, a gene conferring APR, is not present in Capo. Diversity array technology (DArT) marker will be added to the present microsatellite (SSR) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) map. Two further Capo cross derived populations are also under investigation.

### Keywords

*Puccinia recondita*, QTL mapping, *Triticum aestivum*

### Einleitung

Braunrost, hervorgerufen durch den Pilz *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, ist eine weltweit verbreitete Krankheit von Weizen. Ein starker Befall führt aufgrund der verfrühten Blattseneszenz zu Ertragseinbußen. In Österreich ist dieser Pilz besonders im Osten, im pannonischen Trockengebiet, verbreitet. Hier sind Reduktionen des Kornertrags von bis zu 20 % möglich (ZWATZ 1998). Vielfach ist der Einsatz von Fungiziden jedoch nicht wirtschaftlich bzw. im öko-

logischen Landbau überhaupt nicht zulässig. Daher ist der Anbau resistenter Sorten von großer Bedeutung.

Braunrostresistenz kann zwei Ursachen haben: Die Resistenz beruht entweder auf einem oder wenigen Hauptgenen (*Lr*-Gene) oder auf sogenannten QTLs (quantitative trait loci). Bisher sind über 50 *Lr*-Gene beschrieben (MACINTOSH 1995, MCINTOSH et al. 1995, SCHNURBUSCH et al. 2004). Nur wenige davon gelten als dauerhaft, so zum Beispiel *Lr46* (SINGH et al. 1998) und *Lr34* insbesondere in Kombination mit *Lr12* oder *Lr13* (ROELFS 1988). Gegenüber den meisten anderen bekannten *Lr*-Genen sind früher oder später virulente Pilzrassen aufgetreten, sodass diese heute nicht mehr bzw. nur mehr regional wirksam sind. Als dauerhafter haben sich quantitative Resistenzen der erwachsenen Pflanze erwiesen. Diese führen nie zu einer vollständigen Resistenz, sondern sie bewirken z.B. eine längere Latenzperiode, eine langsamere Ausbreitung auf der Pflanze oder eine geringere Sporulationsfähigkeit. Dadurch sind die Pflanzen nicht völlig befallsfrei, weshalb auch der Selektionsdruck auf den Pilz geringer ist.

Braunrostresistenz kann nur in aufwändigen Inokulationsversuchen getestet werden. Sämlingstests sind nicht ausreichend, wenn die Resistenz erst in der erwachsenen Pflanze wirksam ist (APR, adult plant resistance). Deshalb könnten molekulare Marker für *Lr*-Gene bzw. QTLs die praktische Pflanzenzüchtung vereinfachen. Schon in einem sehr frühen Züchtungsstadium können große Pflanzenzahlen in kurzer Zeit vorselektiert werden, da dazu nur DNS (Desoxyribonukleinsäure) von wenigen Blättern notwendig ist.

### Material und Methoden

Untersucht wurden 240 Inzuchtlinien (RILs, recombinant inbred lines), (F<sub>6,7</sub>) der Kreuzung Capo x Isengrain. Die von Hermann Hänsel gezüchtete und 1989 zugelassene Qualitätswinterweizensorte Capo (Pokal/Martin) der Probstdorfer Saatzucht scheint dauerhaft braunrostresistent zu sein. Im Jahr der Zulassung wurde ihre Anfälligkeit gegenüber Braunrost auf einer Skala von 1 (fehlend/sehr gering) - 9 (sehr stark) mit 2 (sehr gering bis gering) beurteilt, bis vor wenigen Jahren mit 3 (gering) und erst seit kurzem wird sie

<sup>1</sup> Universität für Bodenkultur Wien, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

<sup>2</sup> Research Institute of Plant Production, Bratislavská cesta 122, SK-921 68 PIEŠŤANY

<sup>3</sup> Saatzucht Donau GesmbH & CoKG, Saatzuchtstrasse 11, A-2301 PROBSTDORF

\* Ansprechpartner: Dipl.-Ing. Lydia MATIASCH, lydia.matiasch@boku.ac.at

mit 4 (gering bis mittel) eingestuft (AGES 2009). Außerdem zeigt sie eine sehr geringe Anfälligkeit gegenüber Gelbrost (*Puccinia striiformis*) sowie mittlere Anfälligkeit gegenüber Mehltau (*Erysiphe graminis*) und Septoria (*Septoria* spp.). Aufgrund der Summe seiner agronomischen Eigenschaften ist Capo auch 20 Jahre nach seiner Zulassung immer noch die dominante Qualitätswinterweizensorte in Österreich. Sie macht fast ein Viertel der Vermehrungsfläche für Z-Saatgut aus. Im pannonischen Trockengebiet bzw. für den ökologischen Landbau macht Capo sogar ca. ein Drittel der Fläche aus, das ist mehr als die Flächen der nächsten drei Sorten zusammen (BAES 2009). In Sämlingstests wurde in Capo *Lr13* nachgewiesen (WINZELER et al. 2000). Dieses allein ist allerdings in weiten Teilen Europas nicht mehr wirksam und erklärt damit nicht die geringe Anfälligkeit dieser Sorte (MESTERHÁZY et al. 2000). In einem ersten Schritt sollte abgeklärt werden, ob Capo zusätzlich *Lr34* hat, das in Sämlingstests nicht gut untersucht werden kann (MESTERHÁZY et al. 2002), da es erst in der erwachsenen Pflanze wirksam ist. Capo zeigt allerdings nicht die typische Blattspitzendürre, die mit *Lr34* eng gekoppelt ist (SINGH 1992). Isengrain (Apollo/Soissons) ist eine französische Weizensorte, gezüchtet von Florimond Desprez. Aufgrund ihrer Anfälligkeit gegenüber Braunrost wurde sie als Kreuzungspartner gewählt.

In den Jahren 2004 bis 2009 wurden die 240 RILs sowie die Eltern- und Standardlinien in insgesamt 18 Versuchen auf 6 Standorten (Aumühle, Tulln und Rust im Tullnerfeld; Schmida bei Hausleitern im Bezirk Korneuburg; Probstdorf im Marchfeld; Piešťany in der Slowakei) getestet. Das Versuchsdesign war eine vollständig randomisierte Blockanlage mit 2 Wiederholungen. Um einen gleichmäßigen Krankheitsdruck auf der gesamten Versuchsfläche zu gewährleisten und auch um diesen überprüfen zu können,

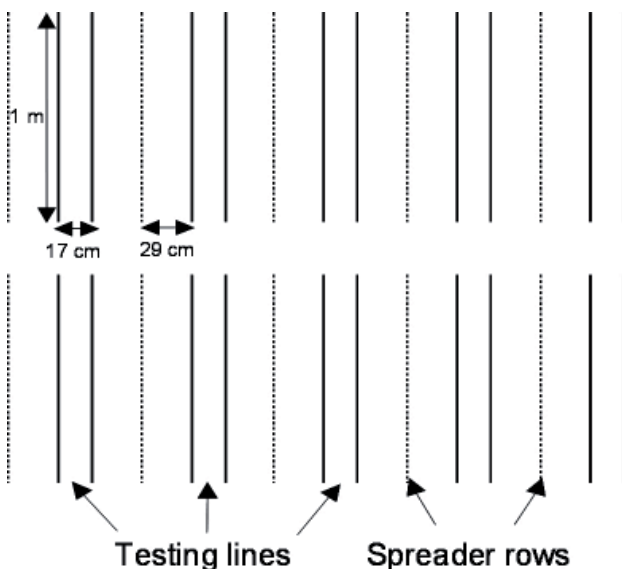


Abbildung 1: Versuchsdesign. Links und rechts jeder Doppelreihe einer Prüflinie befindet sich ein Infektionsstreifen aus einem Gemisch braunrostanfälliger Sorten.

Figure 1: Experimental design. Left and right of each double row of testing lines is a spreader row of leaf rust susceptible cultivars.

wurde jeweils links und rechts der Doppelreihe jedes Prüfglieds ein sogenannter Infektionsstreifen angebaut (Abbildung 1). Hierfür wurde ein Gemisch braunrostanfälliger Sorten verwendet.

Verschiedene künstliche Inokulationsmethoden wurden ausprobiert: Auspflanzen von infizierten Sämlingspflanzen, die zuvor im Glashaus durch Ansprühen mit einer wässrigen Sporensuspension inokuliert wurden, in die Infektionsstreifen; Injektion der Sporensuspension direkt in die Blattscheide von Pflanzen in den Infektionsstreifen; flächendeckendes Sprühen einer ölbasierten Sporensuspension mit ULVA+ (Micron Sprayer Ltd., Bromyard, Herefordshire, UK). Am effektivsten war das direkte Ansprühen einer Pflanze je Infektionsstreifen während des Bestockens (BBCH 20-29) am späten Nachmittag mit ca. 2 ml einer wasserbasierten Sporensuspension (ca. 10 Mio. Sporen/ml) und anschließender Abdeckung über Nacht.

Für die Bonitur wurde das Schema von Abbildung 2 verwendet, wobei die Skala, sofern notwendig, in 10er Schritten bis 100 % Befall erweitert wurde.

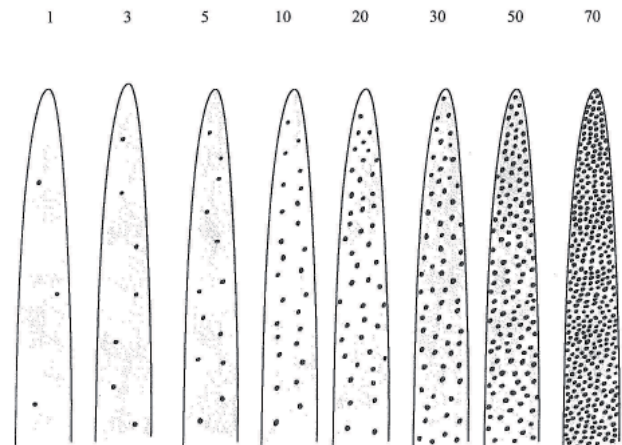


Abbildung 2: Boniturschema zur Schätzung des Prozentanteils mit Braunrost befallener Blattfläche (MOLL et al. 1996; zitiert in BARTELS und BACKHAUS 2000)

Figure 2: Scoring aid for estimating percentage of leaf rust infected leaf area

Der Befall mit Braunrost war leider nicht in allen Jahren ausreichend stark bzw. früh genug, um bonitiert werden zu können bzw. ausreichend zu differenzieren. Deshalb konnten für die weiteren Berechnungen nur die Daten von 11 Versuchen verwendet werden.

Parallel dazu wurde die Population mit molekularen Markern (SSR, simple sequence repeats; AFLP, amplified fragment length polymorphism) charakterisiert. Die Berechnung der aktuellen genetischen Karte basiert auf 130 SSR- und 483 AFLP-Markern. Verwendet wurde JoinMap® Vers. 4 mit Evaluation License (Haldane's mapping function, ansonsten Grundeinstellungen). Die resultierenden Kopplungsgruppen decken alle Chromosomen ab. Die anschließende QTL-Analyse erfolgte mit dem Programm Cartographer® Vers. 2.5. Für die Auswertung der Feldversuche mittels Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variances) bzw. die Einzelmarker-ANOVA wurde das Programm SAS® Vers. 9.2 TS Level 1M0 verwendet.

## Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse lässt sich ausschließen, dass Capo *Lr34* enthält. Die beiden bei SUENAGA et al. (2003) für dieses Resistenzgen beschriebenen Marker *Xgwm130* und *Xgwm295* wurden auch in dieser Population auf Chromosom 7D in geringem Abstand kartiert. Die Allele unterscheiden sich nicht signifikant hinsichtlich des Braunrostbefalls (MATIASCH et al. 2007). Boxplots der Population für die Allele der beiden Eltern Capo (C) und Isengrain (I) sowie Heterozygote (H) von *Xgwm130* sind in *Abbildung 3* gezeigt. Die Verteilung des Braunrostbefalls (Mittelwert über alle 11 Experimente) ist für alle 3 Allelgruppen nahezu ident.

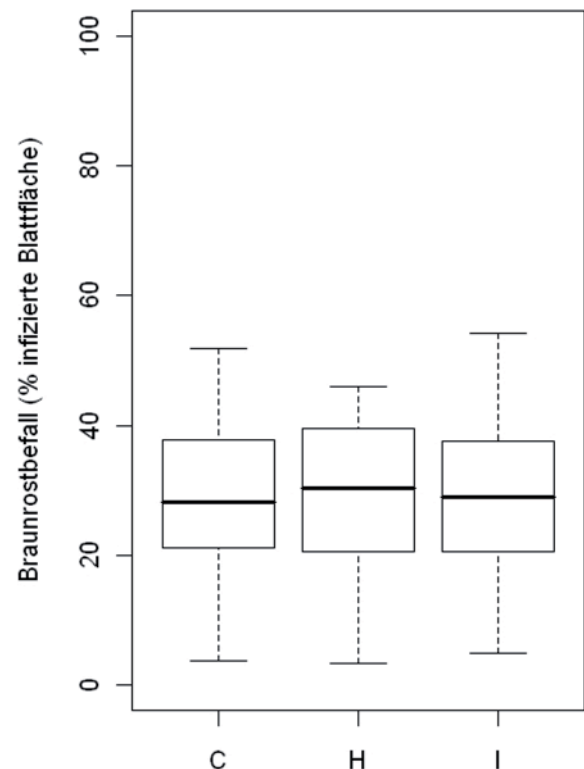
Der bisher stärkste gefundene QTL konnte auf Chromosom 7BL lokalisiert werden. Diese Resistenz wird von Isengrain vererbt. In Sämlingstests konnte bereits von BLASZCZYK et al. (2004) *Lr14a* in Isengrain nachgewiesen werden. Sowohl Isengrain selber als auch Thatcher NILs mit *Lr14a* und *Lr14b* waren im Versuch in Tulln 2007 mit bis zu 60 % befallener Blattfläche wesentlich stärker infiziert als die RILs mit dem entsprechenden Isengrain-Allel. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen VIDA et al. (2009). Der Koeffizient durchschnittlichen Befalls lag für *Lr14a* bei fast 90 %, für *Lr14b* bei 60 %. Hingegen zeigten Thatcher NILs mit *Lr19* weder in Tulln noch in Martonvásár (VIDA et al. 2009) Befall mit Braunrost. Bei Durum wurde *Lr19*, das ursprünglich aus *Agropyron elongatum* (syn. *Thynopyrum ponticum*) (CHERUKURI et al. 2003) stammt, auf Chromosom 7B eingekreuzt. Ein Vergleich der Isengrain-Allele der in der Population signifikanten Marker mit denen von verschiedenen Sorten, für die *Lr14a* bzw. *Lr19* nachgewiesen wurde, ist auf jeden Fall noch notwendig, um diesen QTL besser einordnen zu können.

Für Capo konnte bisher nur ein QTL gefunden werden, der über dem Grenzwert liegt. Dieser ist jedoch nicht in allen Versuchen signifikant. Dass kein stärkerer QTL gefunden wurde, könnte daran liegen, dass die Karte in einzelnen Bereichen noch nicht ausreichend dicht ist. Deshalb werden aktuell noch zusätzlich DArT (diversity array technology) Marker gemacht, um die Kopplungskarte zu verfeinern.

Eine andere Ursache könnte sein, dass für die Resistenz von Capo sehr viele Gene verantwortlich sind, von denen jedes einzelne nur einen derart geringen Beitrag leistet, dass sie in der Kreuzungspopulation mit Isengrain nicht als QTL erkennbar sind. Zwei weitere Kreuzungspopulationen - Arina x Capo und Furore x Capo - sollen noch mit genetischen Markern charakterisiert werden. Es ist zu erwarten, dass Capo QTLs aufgrund der stärkeren Braunrostanfälligkeit der Kreuzungspartner verglichen mit Isengrain besser zu sehen sind.

## Danksagung

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Projekte wurden unterstützt vom Österreichischen Fonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung (FWF) Projektnummer L182-B06, sowie im Rahmen von INTERREG IIIA Österreich-Slowakei (Kofinanziert vom Europäischen Fonds für Regionale Entwicklung (EFRE) der Europäischen Union und der niederösterreichischen Landesregierung). Vielen Dank



**Abbildung 3: Boxplotdarstellung des Braunrostbefalls (Mittelwert über alle 11 Experimente) der 240 RILs der Kreuzung Capo x Isengrain. Die Gruppen sind getrennt nach den Allelen C (Capo), H (Heterozygot) und I (Isengrain) für Mikrosatellitenmarker *Xgwm130*. Mittelwert für Capo 26,7 %, Isengrain 35,5 %**

**Figure 3: Boxplots for leaf rust infection (mean over all 11 experiments) of the 240 Capo x Isengrain RILs. Groups are separated for the alleles C (Capo), H (heterozygous) and I (Isengrain) of microsatellite marker *Xgwm130*. Mean of Capo 26.7 %, Isengrain 35.5 %**

an die zahlreichen Helferinnen und Helfer für die wichtige Unterstützung bei der künstlichen Inokulation, Matthias Fidesser für die Durchführung aller pflanzenbaulichen Feldarbeiten sowie allen Projektpartnern für die Betreuung von Versuchen.

## Literatur

- AGES, 2009: Österreichische beschreibende Sortenliste 2009, Landwirtschaftliche Pflanzenarten, Schriftenreihe 21/2009. Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Wien.
- BAES, 2009: Feldanerkennungsflächen der Saison 2007/2008 (Ernte 2008). Bundesamt für Ernährungssicherheit, Wien [Available online: <http://www.baes.gv.at/saat-pflanzgut/statistiken/feldanerkennungs-flaechen/>; accessed 20 Nov 2009].
- BARTELS G, BACKHAUS GF, 2000: Die Prüfung von Pflanzen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Schadorganismen in der Biologischen Bundesanstalt. Teil 2: Resistenzprüfungen von Kulturpflanzen im Acker- und Gartenbau gegen Pilze, Bakterien und Viren. Mitt Biol Bundesanst Land- Forstwirtschaft 373. Paul Parey, Berlin.
- BLASZCZYK L, GOYEAU H, HUANG XQ, RÖDER M, ŚTEPIEŃ Ł, CHELKOWSKI J, 2004: Identifying leaf rust resistance genes and mapping gene *Lr37* on the microsatellite map of wheat. Cell Mol Biol Lett 9, 869-878.

- CHERUKURI DP, GUPTA SK, CHARPE A, KOUL S, PRABHU KV, SINGH RB, HAQ QMR, CHAUHAN SVS, 2003: Identification of a molecular marker linked to an *Agropyron elongatum*-derived gene *Lr19* for leaf rust resistance in wheat. *Plant Breeding* 122, 204-208.
- MATIASCH L, HERZOG K, KRAIC J, ŠUDYOVÁ V, ŠLIKOVÁ S, LÖSCHENBERGER F, LAFFERTY J, BÜRSTMAYR H, 2007: Molecular genetic analysis of durable adult plant leaf rust resistance in the Austrian winter wheat cultivar 'Capo'. In: Bericht der 57. Jahrestagung 2006 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, p 111. HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Irdning.
- MCINTOSH RA, WELLINGS CR, PARK RF, 1995: Wheat rusts - an atlas of resistance genes. Kluwer Acad Publ, Dordrecht.
- MESTERHÁZY Á, BARTOŠ P, GOYEAU H, NIKS RE, CSÖSZ M, ANDERSEN O, CASULLI F, ITTU M, JONES E, MANISTERSKI J, MANNINGER K, PASQUINI M, RUBIALES D, SCHACHERMAYR G, STRZEMBICKA A, SZUNICS L, TODOROVA M, UNGER O, VANCO B, VIDA G, WALTHER U, 2000: European virulence survey for leaf rust in wheat. *Agronomie* 20, 793-804.
- MESTERHÁZY Á, WINZELER M, PARK RF, BARTOŠ P, GOYEAU H, 2002: Europäische Virulenzverteilung in Braunrost des Weizens und Resistenzgene in Europa. In: Bericht der 52. Tagung 2001 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, pp 25-36. BAL Gumpenstein, Irdning.
- MOLL E, WALTHER U, FLATH K, PROCHNOW J, SACHS E, 1996: Methodische Anleitung zur Bewertung der partiellen Resistenz und die SAS-Anwendung RESI. Ber Biol Bundesanst Land- Forstwirtsch 12. Saphir, Ribbesbüttel.
- ROELFS AP, 1988: Resistance to leaf rust and stem rust in wheat. In: Simmonds NW, Rajaram S (eds), *Breeding strategies for resistance to the rusts of wheat*, 10-22. CIMMYT, México.
- SCHNURBUSCH T, PAILLARD S, SCHORI A, MESSMER M, SCHACHERMAYR G, WINZELER M, KELLER B, 2004: Dissection of quantitative and durable leaf rust resistance in Swiss winter wheat reveals a major resistance QTL in the *Lr34* chromosomal region. *Theor Appl Genet* 108, 477-484.
- SINGH RP, MUJEEB-KAZI A, HUERTA-ESPINO J, 1998: *Lr46*: a gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathol* 88, 890-894.
- SINGH RP, 1992: Association between gene *Lr34* for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in wheat. *Crop Sci* 32, 874-878.
- SUENAGA K, SINGH RP, HUERTA-ESPINO J, WILLIAM HM, 2003: Microsatellite markers for genes *Lr34/Yr18* and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathol* 93, 881-890.
- VIDA G, GÁL M, UHRIN A, VEISZ O, SYED NH, FLAVELL AJ, WANG Z, BEDŐ Z, 2009: Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica* 170, 67-76.
- WINZELER M, MESTERHÁZY Á, PARK RF, BARTOŠ P, CSÖSZ M, GOYEAU H, ITTU M, JONES E, LÖSCHENBERGER F, MANNINGER K, PASQUINI M, RICHTER K, RUBIALES D, SCHACHERMAYR G, STRZEMBICKA A, TROTTET M, UNGER O, VIDA G, WALTHER U, 2000: Resistance of European winter wheat germplasm to leaf rust. *Agronomie* 20, 783-792.
- ZWATZ B, CATE P, BERGER HK, 1998: Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge im Getreide- und Maisbau, 4. Aufl. Jugend und Volk, Wien.

## Markergestützte Selektion der optimalen DH-Linie Marker-assisted selection of the optimal DH-line

Wolfgang Link<sup>1\*</sup> und Heiko C. Becker<sup>1</sup>

### Abstract

A marker-assisted identification of optimal doubled-haploid (DH) lines from bi-parental crosses is the more tempting the more relevant genes are available for marker-based selection. Yet, the number of lines that have to be developed to allow an optimal line to occur in a cross increases in parallel. For combining 6 or more genes the usually developed number of DH-lines is far too small. For instance, a DH-line that combines N=6 unlinked genes in optimal combination occurs on average once among 64 lines, and it needs a sample of 293 such lines to end up with at least one optimal line in 99% of cases. A line that combines N=8 genes asks for a family of 1.177 instead of 293 - far more than the 50 to 200 lines that are usually produced. An efficient proposal is to prepend a step of 'F<sub>2</sub>-enrichment' prior to striving for the ultimate, optimal DH-line. So-called 'useful' F<sub>2</sub>-plants that - instead of the F<sub>1</sub> - may serve as sources of optimal DH-lines, are far more frequently occurring than optimal DH-lines do; the relation is  $(3/4)^N/(1/2)^N$ , which for e.g. N=8 is about 26 in favour of such 'useful' F<sub>2</sub>-plants. Further considerations and useful references are presented.

### Keywords

Doubled-haploid line, marker-assisted selection, optimal DH-line

### Was soll man sich unter einer optimalen DH-Linie vorstellen?

Aus einer Kreuzung von zwei homozygoten Linien erhält man eine F<sub>1</sub>-Hybride, die an denjenigen Loci heterozygot ist, an denen die Eltern unterschiedliche Allele tragen. Entwickelt man aus den Gameten dieser F<sub>1</sub> doppelt-haploide (DH)-Linien, so ist diese Familie von Linien an ebendiesen Loci polymorph. Diejenige der DH-Linien die den „besten“ agronomischen Wert hat kann man als optimal bezeichnen.

Heute stehen für zunehmend mehr relevante Loci molekulare Marker zur Verfügung (MACKAY et al. 2009). Wir gehen hier vom günstigsten Fall aus, also von co-dominanten und perfekten Markern (0 cM Abstand zum Ziel-Locus, Allelspezifischer Marker); außerdem von freier Rekombination aller betrachteter Merkmalsloci- bzw. Markerloci-Paare. Ist die Kopplung zwischen Marker und Ziel-Gen nicht

perfekt, dann lohnt es sich, zwei flankierende Marker pro Ziel-Gen zu benutzen. WANG et al. (2007) berichten, wie bei dem Versuch, das Allel *Glu-A3* (Kornspeicherprotein in Weizen) mit dem Allel *tin* (Bestockung) zu kombinieren, nur knapp 15% der resultierenden Linien die entsprechende Gen-Kombination aufwiesen, und dass diese Linien nur 80% statt 100% der markerbasiert selektierten Linien waren. Der Grund war die in Repulsion vorliegende Kopplung (3,8cM) zwischen *tin* und *Glu-A3* (für *Glu-A3* wurde ein perfekter Marker benutzt) und ein 0,8cM Abstand zwischen dem Locus für *tin* und seinem Mikrosatelliten-Marker.

Kennt man für eine Anzahl N relevanter Loci den Marker des jeweils gewünschten Allels, dann kann man diejenigen DH-Linien, die an allen diesen Loci für den gewünschten Marker und also für das gewünschte Allel homozygot sind als optimale DH-Linien betrachten. Betrachtet man beispielsweise N=3 solche Loci in einer Kreuzung, dann erwartet man, dass  $(1/2)^3 = 12,5\%$  aller DH-Linien aus dieser Kreuzung zu den optimalen DH-Linien gehören.

Tatsächlich ist der Vorschlag, DH-Linien für die Pflanzenzüchtung einzusetzen inzwischen über 60 Jahre alt (CHASE 1949). MELCHERS und LABIB (1970) bezeichneten den Einsatz von DH-Linien als „neuen Durchbruch für die Pflanzenzüchtung“. Nur wenige Jahre später konnten z.B. beim Raps mittels Antherenkultur Haploide erzeugt werden (THOMAS und WENZEL 1975), und als kurz darauf gezeigt wurde, dass und wie man auch aus Mikrosporen des Rapses haploide Pflanzen erzeugen kann (LICHTER 1982), war der Weg für die routinemäßige Anwendung dieser neuen Technologie vorgezeigt.

Selbst beim Raps wird aber die DH-Technik bisher nur begrenzt eingesetzt. Eine Umfrage von MÖLLERS und IQBAL (2009) bei den deutschen Rapszüchtern ergab, dass einerseits alle Züchterhäuser die DH-Technik einsetzen, dies jedoch andererseits nur (im Mittel) in 30% ihrer Kreuzungen. Die in der Umfrage genannten Schwierigkeiten sind zuallererst der niedrige Samenertrag der primären doppelt-haploiden Pflanzen. Des Weiteren werden häufig Probleme bei der Diploidisierung und Regeneration genannt.

### Was sind die Gründe, DH-Linien in der Züchtung zu erzeugen?

Die Nutzung der DH-Technologie bringt, so wird argumentiert, dreierlei: (1) Beschleunigung der Züchtung, (2) höheren Selektionserfolg, und (3) Einsparung in den Po-

<sup>1</sup> Georg-August-Universität Göttingen, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Von Siebold Straße 8, D-37075 GÖTTINGEN

\* Ansprechpartner: Prof. Dr. Wolfgang LINK, wlink@uni-goettingen.de

pulationsumfängen, die man bearbeiten muss. Eine Zeiterparnis durch den Einsatz von DH-Linien ist unbestreitbar, dies können bei Winterraps 1 bis 2 Jahre sein. Sogar wenn man in einer Standard-Variante der DH-Technik - aufgrund des beklagten geringen Samenansatzes der primären DH-Pflanzen - eine Vorvermehrung einschieben muss, kann man die Sortenkandidaten ein Jahr früher als ohne DH-Technik (konventionell) zur offiziellen Prüfung anmelden (*Tabelle 1*, PAULMANN und FRAUEN 1991). Das Argument eines höheren Selektionserfolges bezieht sich entweder auf den Vergleich mit einer konventionellen Pedigree-Methode oder mit einer Einzelkornramsch-Methode (single seed descent, SSD), wie sie ja häufig in der Züchtung von Selbstbefruchtern eingesetzt wird. Dabei ist ein höherer Selektionserfolg pro Zeit schon dann gegeben, wenn nur der Züchtungszyklus durch Nutzung der DH-Technik kürzer ist; auf den Zeitgewinn haben wir uns oben schon verständigt. Außerdem ist zwischen den homozygoten DH-Linien oder SSD-Linien eine größere genetische Varianz gegeben als zwischen den  $F_2$ -Individuen. Beide, die Linien aus DHs bzw. SSDs und die  $F_2$ -Individuen sind jeweils die früheste Generation, die eine Auslese erlaubt. Wenn für ein bestimmtes Merkmal strenge intermediäre Vererbung vorliegt, dann haben wir zwischen  $F_2$ -Individuen halb so viel genetische Varianz wie zwischen DHs oder SSDs. Das entspricht der bekannten Tatsache, dass Mittelwerte eine kleinere Varianz haben als Einzelwerte: die Werte der  $F_2$ -Individuen stellen für jeden Locus die Mittelwerte der beiden zufällig gezogenen Gameten dar, die andererseits allein, ohne „Vermischung“ mit anderen Allelen, der haploide Ursprung je einer der homozygoten Linie sind.

In erster Näherung, insbesondere wenn man Kopplung ignoriert, ist eine Familie von DH-Linien identisch mit einer Familie von SSD-Linien. Man muss jedoch auch beachten, dass die SSD-Linien mehr Zeit zu ihrer Erzeugung brauchen und - je nach Generation - noch einen kleinen Anteil restlicher Heterozygotie aufweisen. Liegt Kopplung zwischen den Loci vor, so ist die Varianz zwischen DH-Linien größer oder kleiner als zwischen SSD-Linien (SNAPE 1976). Größer, wenn die Kopplung überwiegend allele Gene in 'coupling' Phase zusammenhält („gut mit gut“), und kleiner, wenn die Kopplung Gene in 'repulsions' Phase zusammenhält („gut mit schlecht“). Da häufig diese

**Tabelle 1: Zeitersparnis durch Einsatz der DH-Technik in der Winterrapszüchtung (schematisch, nach PAULMANN und FRAUEN 1991)**

**Table 1: Saving of time by the use of doubled-haploid technology in winter rapeseed breeding (PAULMANN and FRAUEN 1991)**

Jahr	Konventionell	Methodische Alternativen	
		DH (Standard)	DH (Schnell)
1	Kreuzung	Kreuzung	Kreuzung
2	$F_1$	DH-Produktion	DH-Produktion
3	$F_2$ Beobachtung	Vermehrung	DH Beobachtung
4	$F_3$ Beobachtung	DH Beobachtung	LP Ertrag
5	$F_4$ LP Ertrag	LP Ertrag	LP Ertrag
6	$F_5$ LP Ertrag	LP Ertrag	Anmeldung
7	$F_6$ LP Ertrag	Anmeldung	
8	Anmeldung		

Phasen nicht exakt bekannt sind, ist diese Betrachtung eben häufig rein theoretischer Natur. Man kann allerdings davon ausgehen, dass bei einer Kreuzung des Typs Elite  $\times$  Exot durch die theoretisch bis zu doppelt so hohe Chance für die meiotische Rekombination, die die SSD-Linien bieten (HALDANE and WADDINGTON 1931), das Elite-Genom mit dem exotischen Genom stärker rekombiniert wird, so dass Linien mit intermediärem Charakter häufiger auftreten und die Varianz zwischen den Linien kleiner wird als es bei einer solchen Kreuzung nach nur einer Meiose für DH-Linien der Fall sein wird. SMITH et al. (2008) fanden bei Mais ( $x=10$  Chromosomen), dass 37% der DH-Linien vier oder mehr elterliche Chromosomen noch intakt enthielten, wogegen das nur bei 13% der SSD-Linien der Fall war. Die dadurch höhere Varianz zwischen DH-Linien kann in diesem speziellen Fall ein Vorteil sein: wenn es nämlich darum geht, Linien zu finden, die außer einem Chromosom des Exoten-Elters alle anderen Chromosomen des Elite-Elters tragen. Will man aber aus dem exotischen Chromosom nur ein einzelnes Gen übertragen haben (minimaler 'linkage drag'), dann wird eine innige Rekombination zwischen Exot und Elite gebraucht, wie sie in DH-Linien nicht zustande kommt. Tatsächlich würde man in diesem Fall eher eine Rückkreuzung durchführen, um dann DHs oder SSD zu erzeugen (siehe z.B. FRISCH und MELCHINGER 2007).

Man muss eine kleinere Anzahl primärer DH-Pflanzen pro Kreuzung erzeugen und analysieren, um das Auftreten des gewünschten optimalen Genotyps zu ermöglichen, als man  $F_2$ -Individuen pro Kreuzung erzeugen müsste (*Tabelle 2*). Zum einen ist die Häufigkeit eines bestimmten Homozygoten in  $F_2$  nur 1/4 pro Locus, also bei N (ungekoppelten) Loci  $(1/4)^N$ ; dagegen ist diese Häufigkeit bei DHs (oder SSDs) 1/2. So tritt in einer Kreuzung, in der beispielweise 8 Loci segregieren, eine optimale Linie im Mittel einmal in 256 Linien auf - ein möglicherweise noch darstellbarer Populationsumfang. Eine solche optimale, 8-fache Homozygote tritt zwar auch als  $F_2$ -Pflanze auf, aber im Mittel nur einmal in einer Population von über 65 000 Individuen. Nun wird allerdings nicht in jeder konkreten Familie von 256 primären DHs exakt einmal diese optimale DH auftreten. Um einigermaßen sicher zu sein, dass sie in einer konkreten Kreuzung auch wirklich wenigstens einmal vorkommt muss man die Populationsgröße über 256 hinaus erhöhen. Betrachten wir nur einen spaltenden Locus, dann sind 50% der DH-Linien optimal. Die Wahrscheinlichkeit, dass die erste aus einer großen Zahl von DHs falsch ist, beträgt also 0,5. Die Wahrscheinlichkeit, dass die zweite DH falsch ist, beträgt ebenso 0,5; und die Wahrscheinlichkeit, dass beide zugleich falsch sind, ist  $0,5^2$ . Analysieren wir sieben DH-Linien, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass alle sieben zugleich falsch sind, nur noch  $0,5^7=1/128=0,0078$  und somit knapp unter 1%. Wir können also mit gut 99% Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass in einer Serie von sieben DH-Linien doch wenigstens eine optimal für den Locus ist. Betrachten wir nunmehr acht Loci zugleich, so muss  $[1-(1/256)]^N$  kleiner als 1% werden, und das ist für  $N=1.177$  gerade der Fall. Statt exakt 256 DH-Linien muss man also zur Sicherheit deutlich über 1000 DHs haben, um mit großer Wahrscheinlichkeit eine ganz bestimmte, für acht Loci optimale DH dabei zu haben. Wenn das auch

**Tabelle 2: Mindest-Populationsgröße (F<sub>2</sub>-Pflanzen, primäre DHs), um einen erwünschten homozygoten Genotyp zu erhalten (α = 0,01) (verändert nach JANSEN 1992, MÖLLERS und IQBAL 2009)**

**Table 2: Minimum population size (F<sub>2</sub>-plants, primary DH lines) to achieve a desirable homozygous genotype (α = 0,01) (modified after JANSEN 1992, MÖLLERS and IQBAL 2009)**

Loci	F <sub>2</sub>				DH	
	Häufigkeit φ „Optimal“	Mindest-Population „Optimal“	Häufigkeit φ „Brauchbar“	Mindest-Population „Brauchbar“	Häufigkeit φ	Mindest-Population „Optimal“
1	1/4	16	3/4	4	1/2	7
2	1/16	72	9/16	6	1/4	16
3	1/64	292	27/64	9	1/8	35
4	1/256	1177	81/256	13	1/16	72
6	1/4096	18861	729/4096	24	1/64	293
8	1/65536	301803	ca. 1/10	44	1/256	1177
16	1/4,295 Mrd	19,85 Mrd	ca. 1/100	458	1/65536	301803
N	φ = (1/4) <sup>N</sup>	M*	φ = (3/4) <sup>N</sup>	M	φ = (1/2) <sup>N</sup>	M

\* M = log(α)/log(1-φ)

eine große Zahl ist, ist eine solche Homozygote in F<sub>2</sub> nur bei völlig unrealistischen Populationsumfängen (hier bei N=301 803) zu erwarten (Tabelle 2). Dieser Vorteil der DH-Linien über die F<sub>2</sub>-en ist unbestreitbar.

Bei der Berechnung einer notwendigen Populationsgröße von 1177 DHs zur Kombination von acht günstigen Allelen war die Annahme, dass man nur eine einzige optimale Linien selektieren möchte. Diese wäre aber sicherlich für sonstige, nicht markergestützt selektierten Eigenschaften noch nicht optimal. Es wäre daher nötig, mehrere, vielleicht 20 solche Linien zu erzeugen, damit man für weitere Eigenschaften wenigsten noch eine gewisse Auswahl hätte. Dafür müsste man nun wesentlich mehr, im Beispiel konkret über 8144 DH-Linien erzeugen - was wiederum in eindeutig unrealistische Größenordnungen führt.

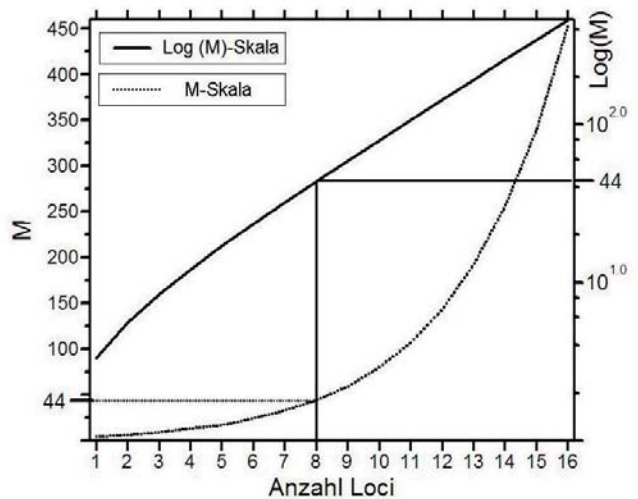
Nach der vorhin erwähnten Umfrage von MÖLLERS und IQBAL (2009) erzeugen die deutschen Rapszüchter Populationsumfänge von 50 bis 200 DHs pro Kreuzung. Diese Anzahlen sind nach der hier verfolgten Argumentation weit unterhalb dessen was notwendig ist, um auch nur für eine geringe Zahl von Genen eine Linie mit optimaler Kombination mit einiger Sicherheit zu erzeugen und zu finden.

### Ist es richtig, auf direktem Weg nach der optimalen DH-Linie zu suchen?

Bei DH-Linien sind wie gesehen pro spaltendem Locus 50% optimal und 50% falsch. In F<sub>2</sub> ist die Situation weniger eindeutig. Zwar sind nur 25% optimal. Aber immerhin 50% der Pflanzen sind weder optimal noch falsch. Sie enthalten einerseits zwar das erwünschte Allel, andererseits aber nur heterozygot. In ihren Selbstungsnachkommen finden sich unter anderem auch die gesuchten Optimalen.

Somit ergibt sich das Konzept der sogenannten „brauchbaren“ Genotypen (siehe z.B. WRICKE und WEBER 1984, S. 28, Tab. 1.12). Dieses sind solche, die entweder schon optimal sind oder aus deren Selbstungsnachkommen noch Optimal herauspalten können. Hier zeigt sich ein günstiges Faktum in F<sub>2</sub>: je spaltendem Locus sind 75% der Individuen brauchbar, mehr als bei DH-Linien (wo es den Unterschied zwischen Brauchbar und Optimal gar nicht gibt). Dadurch kann man, als Beispiel, aus einer Stichprobe von nur 44 F<sub>2</sub>-Pflanzen mit hoher Wahrscheinlichkeit mindestens eine

für 8 Loci gleichzeitig brauchbare F<sub>2</sub>-Pflanze erwarten (Tabelle 2, Abbildung 1), im Vergleich zu der oben genannten Stichprobengröße von 1177, die man bei der Suche nach einer optimalen DH-Linien einsetzen müsste.



**Abbildung 1: Zusammenhang zwischen der Anzahl betrachteter Loci und der Mindest-Populationsgröße in F<sub>2</sub>, um mit 99% Wahrscheinlichkeit wenigstens eine „brauchbare“ F<sub>2</sub>-Pflanze zur Verfügung zu haben (vergl. Tabelle 2)**

**Figure 1: Relationship between number of loci and minimum F<sub>2</sub> population size to achieve with 99% probability at least one „suitable“ F<sub>2</sub>-plant (see Table 2)**

### Zusammenfassend ist zu sagen:

- (1) Bei beispielsweise acht oder mehr Loci treten optimale Genotypen in einer F<sub>2</sub>-Familie praktisch nicht mehr auf, sie sind aber auch in einer DH-Population selten (eine von 256 DH-Linien oder seltener)
- (2) Dagegen treten brauchbare Genotypen in einer F<sub>2</sub> relativ häufig auf (bei acht Loci ca. 10% der Pflanzen; (3/4)<sup>N</sup> = 0,1001)
- (3) Leider kann man aber diese brauchbaren Genotypen an F<sub>2</sub>-Einzelpflanzen visuell kaum erkennen.

Dies ist das Eintrittstor für die DNS-Marker. Nehmen wir eine höhere Anzahl markierter Loci, z.B. N=16. Damit kann man in F<sub>2</sub> ungeachtet der teilweisen Heterozygotie und natürlich ungeachtet irgendwelcher Umwelteffekte



die brauchbaren  $F_2$ -Pflanzen eindeutig erkennen und als Quelle von DH-Linien nutzen ( $F_2$ -enrichment, WANG et al. 2007). Anstatt nun eine aus 4,295 Milliarden  $F_2$ -Pflanzen als optimalen Genotyp zu identifizieren, und anstatt eine aus über 65000 DH-Linien als optimale Linien zu identifizieren (Tabelle 2), identifizieren wir brauchbare  $F_2$ -Individuen, die zu 1,002% vorkommen. In unserem Beispiel sollten wir dazu mindestens 458  $F_2$ -Pflanzen durchmustern.

Unter den brauchbaren  $F_2$ -Individuen gibt es eine deutliche Variation für den Grad ihrer Brauchbarkeit. Man findet zum Beispiel, dass ein knappes Achtel (exakt 0,1265) unter ihnen an 8 oder mehr der 16 Loci schon optimal sind (Abbildung 2). Im Mittel ist also eine aus acht  $F_2$ -Pflanzen zumindest halb optimal. Um mindestens eine solche  $F_2$ -Pflanze tatsächlich zu finden, muss man - in diesem Beispiel - mindestens 34 brauchbare  $F_2$ -Pflanzen untersuchen. Sinnvoll (s.u.) wäre es, mindestens 50 zu untersuchen. Dadurch bekommt man (mit 99% Wahrscheinlichkeit) mindestens zwei solche  $F_2$ -Pflanzen (was die Entwicklung von DHs erlaubt, die für ihr Restgenom stärker verschieden ausfallen).

Für die restlichen acht Loci, an denen unsere brauchbaren  $F_2$ -en ja immer noch nur heterozygot sind, gelten die Angaben in Tabelle 2 für acht Loci. Also beispielsweise, dass man, wenn die brauchbare  $F_2$  noch an sechs oder acht der 16 Loci aufspaltet, man  $N=293$  oder  $N=1117$  DHs daraus entwickeln muss, um mit 99% Wahrscheinlichkeit die erwünschte optimale DH zur Verfügung zu haben. Allerdings mit der Besonderheit, dass die DH-Linien, die aus einer  $F_2$ -Pflanze entwickelt werden, für das restliche Genom nur noch halb so viel genetischer Varianz aufweisen wie das für DHs aus einer  $F_1$  der Fall ist.

Hat man optimale DH-Linien aus verschiedenen  $F_2$ -Pflanzen erzeugt, kann man diese kreuzen, was im weiteren Verlauf eine entsprechend größere genetische Varianz in den Nachkommen verspricht als wenn sie dieselbe Ausgangs- $F_2$  hätten; wobei diese Nachkommenschaften dann für diese 16 Loci optimal fixiert wären und die weitere Züchtung dann wieder ohne Einsatz von Markern oder markergestützt zugunsten weiterer, zusätzlicher Loci ablaufen kann. Ratsam

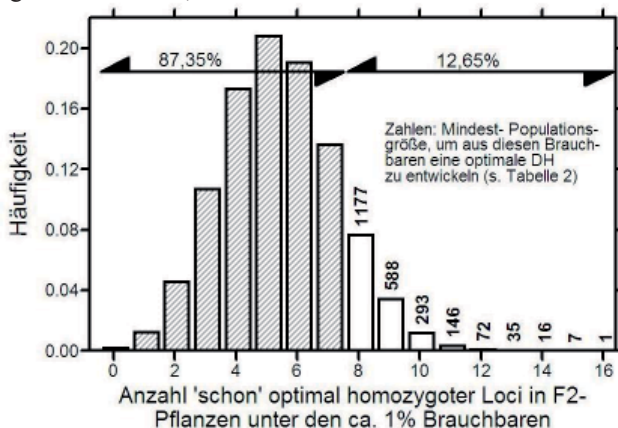


Abbildung 2: Häufigkeit von  $F_2$ -Individuen, die für 0 bis 16 Loci von insgesamt 16 spaltenden Loci schon optimal sind (also für das jeweils bessere Allel homozygot), unter den ca. 1%, die für alle 16 Loci brauchbar sind (siehe Text)

Figure 2: Frequency of  $F_2$ -individuals which are already suitable (homozygous for the desired allele) for 0 to 16 loci of a total of 16 segregating loci among the approx. 1% of genotypes which are suitable for all 16 loci (explanations see text)

wäre, solche DHs aus brauchbaren  $F_2$ -en verschiedener Kreuzungen herzustellen.

Die hier vorgestellten etwas vereinfachten Erwägungen führen zu der Schlussfolgerung, dass

- die üblichen Anzahlen von DHs pro Kreuzung zu klein sind, insbesondere wenn man für eine zunehmende Anzahl wichtiger Loci und QTLs markergestützte Auslese betreiben möchte, und
- dass man eher vermittle einer Vorselektion in  $F_2$  zugunsten von brauchbaren Genotypen mit anschließender DH-Produktion zum Ziel kommt als mit dem Versuch, den optimalen Genotyp direkt in der aus  $F_1$  abgeleiteten DH-Familie zu finden. Weitere Hinweise und weiterführende Literatur findet sich unter anderem bei BERNARDO (2009), LANDE und THOMPSON (1990), FRISCH und MELCHINGER (2001) und WANG et al. (2007).

## Literatur

- BERNARDO R, 2009: Should maize doubled haploids be induced among  $F_1$  or  $F_2$  plants? *Theor Appl Genet* 119, 255-262.
- CHASE SS, 1949: Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize and its component single cross hybrid and inbred lines. *Genetics* 34, 328-332.
- FRISCH M, MELCHINGER AE, 2001: Marker-assisted backcrossing for simultaneous introgression of two genes. *Crop Sci* 41, 1716-1725.
- FRISCH M, MELCHINGER AE, 2007: Variance of the parental genome contribution to inbred lines derived from biparental crosses. *Genetics* 176, 477-488.
- HALDANE JBS, WADDINGTON CH, 1931: Inbreeding and linkage. *Genetics* 16, 357-374.
- JANSEN RC, 1992: On the selection for specific genes in doubled haploids. *Heredity* 69, 92-95.
- LANDE R, THOMPSON R, 1990: Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124, 743-756.
- LICHTER R, 1982: Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* L. *Z Pflanzenphysiol* 105, 427-434.
- MACKAY TFC, STONE EA, AYROLES JF, 2009: The genetics of quantitative traits: Challenges and prospects. *Nature Rev Genet* 10, 565-577.
- MELCHERS G, LABIB G, 1970: Die Bedeutung haploider höherer Pflanzen für Pflanzenphysiologie und Pflanzenzüchtung. *Ber Deut Bot Ges* 83, 129-150.
- MÖLLERS C, IQBAL MCM, 2009: Doubled haploids in breeding winter oilseed rape. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM (eds.), *Advances in haploid production in higher plants*, 161-170. Springer Science.
- PAULMANN W, FRAUEN M, 1991: Einsatz von biotechnologischen Verfahren in der praktischen Rapszüchtung. Bericht 42. Arbeitstagung der Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtleiter, 173-182. BAL Gumpenstein, Irnding.
- SMITH JSC, HUSSAIN TJ, GRAHAM G, PODLICH D, WALL S, WILLIAMS M, 2008: Use of doubled haploids in maize breeding: implications for intellectual property protection and genetic diversity in hybrid crops. *Mol Breed* 22, 51-59.
- SNAPE JW, 1976: A theoretical comparison of diploidised haploid and single seed populations. *Heredity* 36, 275-277.
- THOMAS E, WENZEL G, 1975: Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Z Pflanzenzüchtg* 74, 77-81.
- WANG J, CHAPMAN SC, BONNETT DG, REBETZKE GJ, CROUCH J, 2007: Application of population genetic theory and simulation models to efficiently pyramid multiple genes via marker-assisted selection. *Crop Sci* 47, 582-590.
- WRICKE G, WEBER WE, 1986: Quantitative genetics and selection in plant breeding. W de Gruyter, Berlin.

# Markergestützte Selektion in der praktischen Kartoffelzüchtung - Erfahrungen und Perspektiven

## Marker-assisted selection in practical potato breeding - experience and outlook

Andrea Schwarzfischer<sup>1\*</sup>, Anita Behn, Jennifer Groth,  
Michael Reichmann, Adolf Kellermann und Ye-Su Songe

### Abstract

The application of marker-assisted selection is a very effective new breeding method to develop new potato varieties since genetic markers for very important breeding traits like extreme resistance to PVY and resistances to different potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* Ro1-5, *G. pallida* Pa2,3) are available. We used the markers YES-3A, YES-3B, Gro1 and HC for the evaluation of seedlings of tetraploid crossings and crossings with *Solanum phureja*. 2x and 4x plants with combined resistances were selected very efficiently. Especially ten plants with extreme resistance to PVY and resistance to *G. pallida* are highly valuable for further breeding because, until now, no German cultivar has been described carrying respective resistance combinations. Together with protoplast fusion for direct addition of selected lines with different combined resistances, marker-assisted selection offers a reliable, fast and early usable new breeding strategy for the pyramiding of important traits.

### Keywords

MAS, molecular marker, pyramiding of genes, resistance breeding, *Solanum tuberosum*

### Einleitung

Als die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) vor zehn Jahren mit der Genomanalyse bei Kartoffeln begann, waren zwar nur wenige genetische Marker für züchterisch bedeutende Merkmale bekannt, doch das Potential der markergestützten Selektion (MAS) als revolutionierende neue Zuchtmethodik zeichnete sich deutlich ab. Die entscheidenden Vorteile liegen in der großen Sicherheit der Selektionsergebnisse, da direkt der Genotyp untersucht wird, und in der frühzeitigen Anwendbarkeit im Sämlingsstadium. Bei Kartoffeln führt dies zu einem zeitlichen Vorsprung von mindestens 3 Jahren gegenüber klassischen Ansätzen. Insbesondere die schnelle Erfassung von Zuchtstämmen mit kombinierten (pyramidierten) Eigenschaften wird in Zukunft von großer Bedeutung sein und unter Einsparung von Feldarbeit zur schnelleren Entwicklung von hochwertigem Basiszuchtmaterial und besseren Sorten führen.

Während in den ersten Jahren die Entwicklung relevanter genetischer Marker im Vordergrund der Arbeiten an der LfL stand, sind nunmehr einige genetische Marker für züchterisch sehr bedeutende Merkmale bekannt und werden seit zwei Jahren in größerem Umfang zur MAS eingesetzt. Ergebnisse dieser Forschungsarbeiten werden im Folgenden genauer ausgeführt.

### Markerentwicklung an der LfL

Die Entwicklung genetischer Marker bei Kartoffeln ist, ebenso wie die Kartoffelzüchtung selbst, nicht unproblematisch. Gründe hierfür sind die Tetraploidie und hohe Chromosomenzahl ( $2n=4x=48$ ) dieser Fruchtart. Die erforderliche starke Heterozygotie und die vorwiegend quantitativen Vererbungsmechanismen wichtiger Eigenschaften erschweren die Arbeiten gleichermaßen. Dazu sind über 50 verschiedene Merkmale bei der Sortenentwicklung zu beachten: Knollenform, Schalenbeschaffenheit, Fleischfarbe, Stärkegehalt, Speisewert, Veredelungseignung (Chips, Pommes, Trockenkartoffel), Kaltlagerfähigkeit, Vollnertverträglichkeit, Glykoalkaloidgehalt, Ertragssicherheit sowie verschiedenste Resistenzen gegenüber Viren (PVY, PVS, PLRV, PVM, PVX, PVA), Bakterien (*Erwinia*, *Clavibacter*, *Ralstonia*, *Streptomyces*), Pilze (*Phytophthora*, *Fusarium*, Krebs), Nematoden (*Globodera*) und Insekten (Kartoffelkäfer, Läuse).

Die Markerentwicklung an der LfL konzentrierte sich zunächst auf extreme Resistenz gegen PVY und gute Chips-eignung nach 4°C-Lagerung. Über AFLP-Analysen an 57 Antherenkultur-Abkömmlingen der Y-immunen Sorte Assia gelang es, Marker für dieses monogen dominante Merkmal zu etablieren und auf Chromosom XII zu lokalisieren (SONG 2004, SONG et al. 2005). Inzwischen steht über STS-Marker (SONG und SCHWARZFISCHER 2008) ein einfaches Testsystem für die MAS auf PVY-Immunität zur Verfügung (*Abbildung 1*), das auch beim Bundessortenamt zur Charakterisierung von Sorten und Wertprüfungsstämmen eingesetzt wird. Da im süddeutschen Raum große Virusprobleme bestehen, verbunden mit hohen Aberkennungsraten in der Pflanzguttung, ist dieses Merkmal von großer Bedeutung zur Sicherung des Kartoffelanbaus in Süddeutschland, vor allem seit Auftreten des PVY<sup>NTN</sup>-Stammes, der nicht nur

<sup>1</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 8, 85354 Freising, Deutschland

\* Ansprechpartner: Dr. Andrea SCHWARZFISCHER, andrea.schwarzfischer@LfL.bayern.de

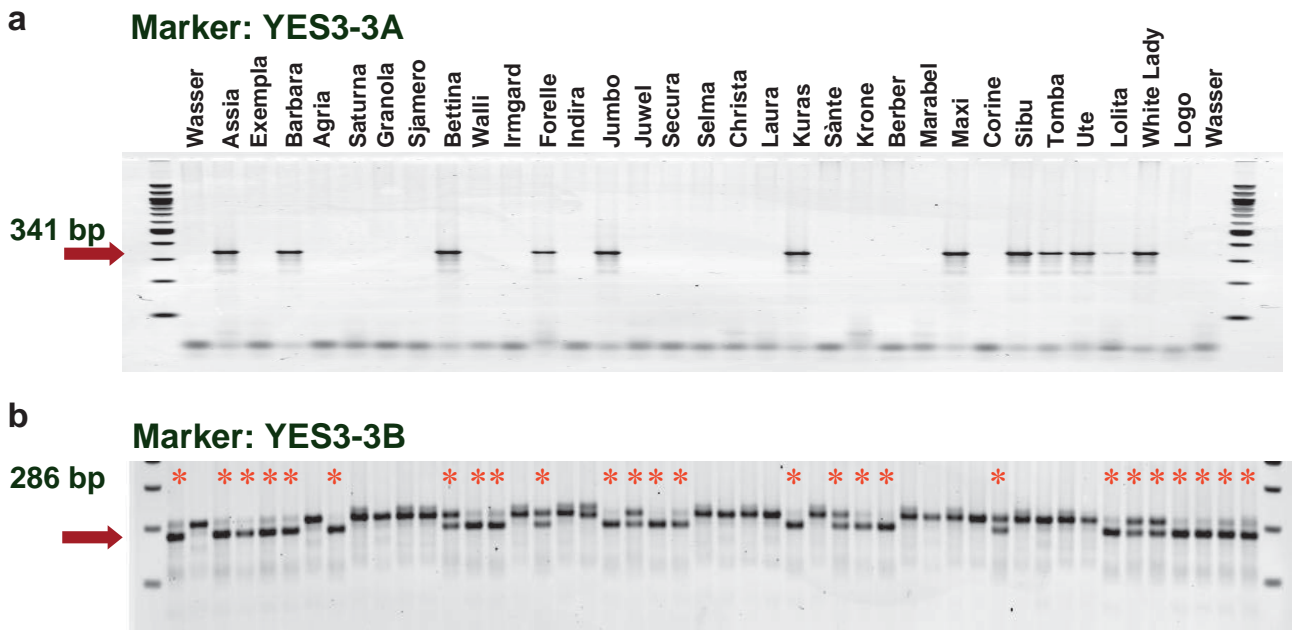


Abbildung 1: Sortenscreening (a) und Markeranalyse von Zuchtstämmen (b) mit den STS-Markern YES-3A und YES-3B auf PVY-Immunität. Mit \* gekennzeichnet sind Stämme, die als resistent eingestuft wurden  
 Figure 1: Screening of cultivars (a) and marker-assisted analysis of breeding lines (b) with STS markers YES-3A and YES-3B diagnostic for extreme resistance to PVY. Lines with \* are breeding lines evaluated as resistant

wie andere PVY-Stämme hohe Ertragseinbußen, sondern zusätzlich Knollennekrosen hervorruft. Die QTL-Kartierung der Chipseignung ergab zahlreiche relevante Marker, die über das gesamte Genom verteilt vorliegen (SONG 2004, SONG et al. 2007). Haupt-QTLs können bisher nur begrenzt zur MAS herangezogen werden, so dass das Frittieren der Chips weiterhin als sicherere Testmethode eingesetzt wird. Neben der Etablierung von Markern gegen *Globodera rostochiensis* Ro2,3,5 (SONG und SCHWARZFISCHER 2007) und *G. pallida* Pa3 konzentrieren sich unsere Arbeiten derzeit auf die Entwicklung von Krebsresistenzmarkern. Erste Marker Kandidaten liegen vor.

**Anwendbarkeit publizierter Marker**

In den letzten Jahren wurden zwei sehr bedeutende Nematoden-Resistenzmarker am Max-Planck Institut in Köln entwickelt. Die Kartoffelnematoden verursachen Ertragsminderungen von über 50% in Befallsgebieten. Insbesondere Durchwuchs in Kartoffelanbaugebieten mit enger Fruchtfolge wie im Donaumoos fördert die Nematodenvermehrung. Auf Befallsflächen können nur noch resistente Sorten angebaut werden. Gerade im Speisebereich sind fast keine resistenten Sorten beschrieben. Der SNP-Marker Gro1 (BARONE et al. 1990, PAAL et al. 2004, GEBHARDT et al. 2006) selektiert nicht nur die Resistenz gegen den Pa-

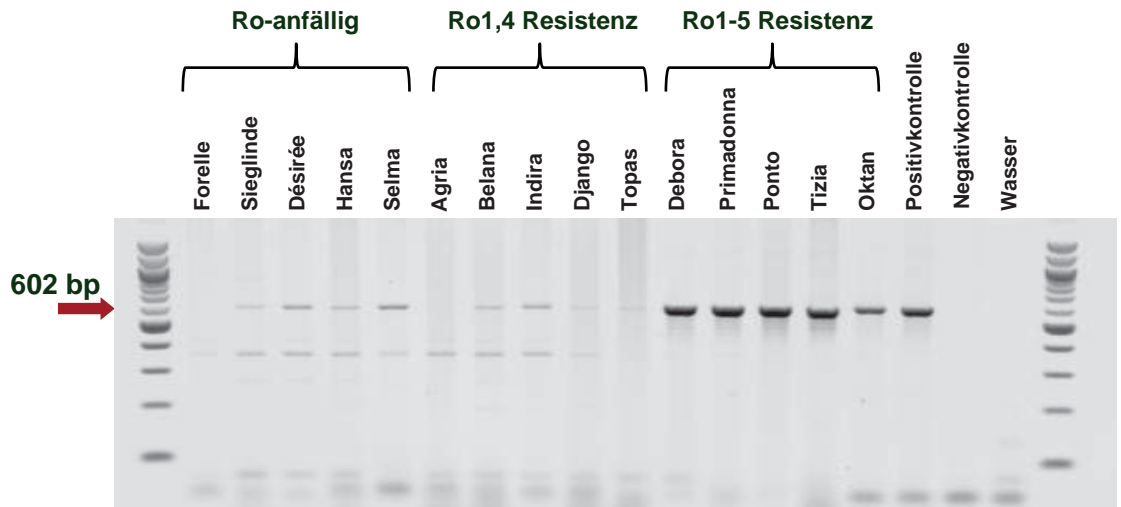
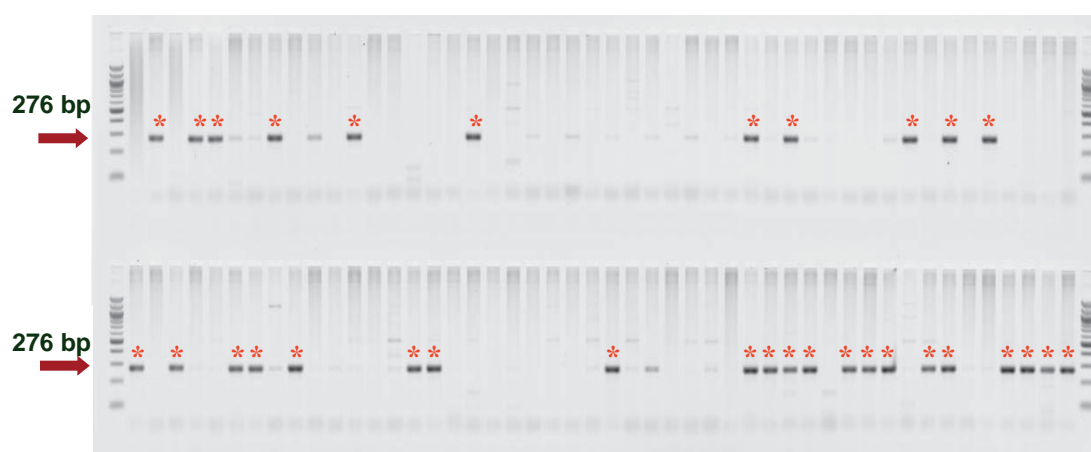


Abbildung 2: Sortenanalyse mit dem Marker Gro 1  
 Figure 2: Screening of cultivars applying the marker Gro 1



**Abbildung 3: Markeranalyse von Zuchtstämmen mit dem Marker HC auf Globodera pallida Pa3-Resistenz. Mit \* gekennzeichnet sind Stämme, die als resistent eingestuft wurden.**

**Figure 3: Marker-assisted analysis of breeding lines tagged with the marker HC diagnostic for resistance to Globodera pallida Pa3. Lines with \* are breeding lines evaluated as resistant.**

thotypen Ro1 oder, wie angedeutet, eine breite Resistenz gegenüber Ro1-4 sondern diagnostiziert in idealer Weise Sorten mit Ro1-5 Vollresistenz (Abbildung 2). Von den 200 deutschen Kartoffelsorten weisen bisher nur 16 Sorten diese Vollresistenz auf.

Seit kurzem ist auch der SNP-Marker HC (SATTARZADEH et al. 2006) zur Selektion der sehr bedeutenden Pa3-Resistenz bei uns im Einsatz. *Abbildung 3* zeigt eine Analyse verschiedener Kreuzungsnachkommen eines resistenten Zuchtstammes der LfL.

### Analyse von tetraploiden Sämlingen über MAS

Im Jahr 2008 wurden 2581 Sämlinge von 16 verschiedenen Kreuzungen mit einem PVY-immunen Elterstamm über MAS evaluiert. Bei 10 dieser Kreuzungen wies ein Kreuzungspartner zudem eine Ro1-5 Resistenz auf, so dass insbesondere auf Nachkommen mit kombinierten Resistenzen selektiert werden konnte. Diese sind aus züchterischer Sicht

extrem wertvoll, da von den 200 deutschen Sorten bisher nur 4 diese beiden Resistenzen in Kombination aufweisen. Alle Ergebnisse sind in *Tabelle 1* zusammengefasst. Insgesamt reagierten die Proben von 1251 Sämlingen (48,5%) positiv hinsichtlich des PVY Immunität-Markers, bei 821 Sämlingen (50%) zeigte der Gro1-Marker eine positive Reaktion und bei 394 Pflanzen (24%) ist auf Grund der Ergebnisse von kombinierten Resistenzen auszugehen. Ihr züchterischer Wert wird nun anhand der Feldergebnisse weiter evaluiert. Bei beiden Merkmalen liegt eine 1:1 Spaltung vor. Damit wird auch die Ro1-5 Resistenz vermutlich monogen dominant vererbt.

### Analyse von primärdihaploiden Sämlingen

Zur Vereinfachung der Kartoffelzüchtung werden seit über 30 Jahren an der LfL Kreuzungen mit der Wildart *Solanum phureja* als Pollenspender durchgeführt. Dabei entstehen zu ca. 8% Samen mit diploiden Embryonen, die

**Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse der MAS 2008 an tetraploiden Sämlingen**

**Table 1: Summary of the results of the marker-assisted selection in 2008 with tetraploid seedlings**

Kreuzung	Anzahl Sämlinge	PVY immun	PVY anfällig	Ro1-5 resistent	Ro1-5 anfällig	PVY+Ro1-5 resistent	PVY + Ro1-5 anfällig
598	192	90	102	131	61	57	28
601	91	52	39	51	40	27	15
603	192	93	99	98	94	45	46
605	26	8	18	19	7	6	5
793	308	149	159	147	161	71	83
794	235	113	122	98	137	43	67
795	107	54	53	52	55	26	27
797	122	58	64	59	63	32	37
798	237	113	129	105	132	53	71
799	134	76	54	61	69	34	29
791	210	111	99				
850	251	117	134				
877	126	65	57				
897	111	44	61				
940	114	52	56				
941	125	56	69				
Summe	2581	1251	1315	821	819	394	408

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der MAS 2009 an primärdihaploiden Sämlingen

Table 2: Summary of the results of the marker-assisted selection in 2009 with primary dihaploid seedlings

Kreuzung	Anzahl Sämlinge	PVY immun	PVY anfällig	Ro1-5 resistent	Ro1-5 anfällig	Pa3 resistent	Pa3 anfällig	PVY+Ro1-5 resistent	PVY+Pa3 anfällig
3154	10	3	7	7	3			2	
3162	53	19	34	37	16			13	
3150	49	13	36			12	37		6
3155	47	17	30			23	24		4
3152	151	55	96						
3157	107	55	52						
3159	12	9	3						
3160	92	43	49						
3161	39	16	23						
3165	44	21	23						
3166	88	37	51						
3169	69	17	52						
3171	69	30	39						
3147	23			16	7				
3153	2			2					
3168	21			6	15				
3156	43					16	27		
3158	49					28	21		
Summe	968	335	495	68	41	79	109	15	10

fast ausschließlich das Erbgut der Mutter aufweisen. Die Samen werden *in vitro* angezogen. Von den Sämlingen wird dann über Flow Cytometrie die Ploidie ermittelt. Diploide Pflanzen werden vermehrt und im Gewächshaus zur Knollenproduktion angebaut. Mit 968 dieser Pflanzen wurde im Jahr 2009 eine MAS durchgeführt. Analysiert wurden 18 Kreuzungsnachkommenschaften, 13 mit PVY Immunität, 5 mit Ro1-5 Resistenz und 4 mit Pa3 Resistenz. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist *Tabelle 2* zu entnehmen. Von 830 Pflanzen reagierten 335 (40%) positiv auf den PVY-Marker, bei 68 (62%) von 109 Pflanzen ist von Ro1-5 Resistenz auszugehen und 79 (42%) von 188 Sämlingen reagierten positiv auf den HC Marker für Pa3-Resistenz. Die Daten weichen etwas von den erwarteten 1:1 Spaltungen ab. Es ist noch zu prüfen, ob dies zufallsbedingt oder durch die spezielle Kreuzungsart hervorgerufen wird, da sich die Beobachtung auch bei fast allen Einzelkreuzungen nachvollziehen lässt. Die Ergebnisse des HC-Markers lassen auf die dominante Vererbung eines Hauptgenes für Pa3-Resistenz schließen. Von besonderer Bedeutung sind auch bei diesen Kreuzungsnachkommen die Pflanzen mit kombinierten Resistenzen. Von einzigartigem Wert sind die 10 Zuchtstämme mit kombinierter PVY Immunität und Pa3-Resistenz, da bisher keine Sorten mit diesen Resistenzkombinationen beschrieben sind.

### Pyramidierung über Protoplastenfusion

Bei der Protoplastenfusion werden von zwei verschiedenen Ausgangsstämmen zellwandlose Einzelzellen (Protoplasten) isoliert und elektrisch miteinander verschmolzen (SCHWARZFISCHER et al. 2002). So können nun diese mehrfach resistenten Linien mit PVY-Immunität und Pa3 Resistenz mit Ro1-5 resistenten Fusionspartnern kombiniert werden. Die resultierenden tetraploiden somatischen Fusionshybride werden nach bisherigen Erfahrungen auf Grund der additiven Vererbung bei der Zellfusion alle Resistenzen ausprägen. Die Protoplastenfusion ist somit eine

ideale Ergänzung zur MAS zur schnellen und gezielten Pyramidierung wertvoller Eigenschaften.

### Zusammenfassung und Ausblick

Der Einsatz der MAS in der Kartoffelzüchtung erweist sich bisher als äußerst hilfreich zur schnellen Selektion von Kreuzungsnachkommen mit kombinierten Resistenzeigenschaften. Die Methode lässt sich gut bereits an kleinen Sämlingspflanzen einsetzen und ist nach bisherigen Erfahrungen als äußerst zuverlässig einzustufen. Mittlerweile liegen erforderliche Marker für züchterisch sehr bedeutende Merkmale vor, so dass auch der hohe Kostenaufwand, der leider immer noch mit der MAS verbunden ist, lohnenswert erscheint, vor allem wenn kombinierte Resistenzen zu erwarten sind. Pflanzen mit völlig neuen Resistenzkombinationen, die bisher nicht im deutschen Sortenspektrum beschrieben sind, konnten über MAS ermittelt werden. Aktuelles Ziel ist die Vereinfachung der Probenaufarbeitung bis hin zur direkten PCR aus Pflanzengewebe mit Hilfe eines sehr empfindlichen Detektionssystems (z.B. Phire-Taq) und die Etablierung eines multiplexen PCR-Ansatzes, bei dem mehrere Merkmale in einer Reaktion erfasst werden können. Damit wird eine erhebliche Reduzierung der Kosten möglich. Wir gehen davon aus, dass in Zukunft nur noch mit ca. 15 Cent/Probe kalkuliert werden muss. Damit wird die MAS nicht nur zu einem sicheren und schnellen Selektionssystem in frühen Generationen, sondern auch zu einer wirtschaftlich interessanten neuen Zuchtmethode, die zu einem gewinnbringenden Züchtungsfortschritt beitragen wird.

### Literatur

BARONE A, RITTER E, SCHACHSCHABEL U, DEBENER T, SALAMINI F, GEBHARDT C, 1990: Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Mol Gen Genet 224, 177-182.

- GEBHARDT C, BELLIN D, HENSELEWSKI H, LEHMANN W, SCHWARZFISCHER J, VALKONEN JPT, 2006: Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor Appl Genet* 112, 1458-1464.
- PAAL J, HENSELEWSKI H, MUTH J, MEKSEM K, MENÉNDEZ CM, SALAMINI F, BALLVORA A, GEBHARDT C, 2004: Molecular cloning of the *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostchiensis*, based on a candidate gene approach. *Plant J* 38, 285-297.
- SATTARZADEH A, ACHENBACH U, LÜBECK J, STRAHWALD J, TACKE E, HOFFERBERT HR, ROTHSTEYN T, GEBHARDT C, 2006: Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping as basis for developing a PCR-based marker highly diagnostic for potato varieties with high resistance to *Globodera pallida* pathotype Pa2/3. *Mol Breed* 18, 301-312.
- SCHWARZFISCHER A, SONG YS, SCHOLZ H, Schwarzfischer J, HEPTING L, 2002: Haploidiezüchtung, Protoplastenfusion und Entwicklung von genetischen Markern zur gezielten Sortenentwicklung bei Kartoffeln. *Vortr Pflanzenzüchtg* 54, 123-130.
- SONG YS, 2004: Genetic marker analysis in potato for extreme resistance ( $Ry_{sto}$ ) to PVY and for chip quality after long term storage at 4°C. Dissertation, Technische Universität Freising-Weihenstephan.
- SONG YS, SCHWARZFISCHER A, 2007: Marker development of potato nematode resistance to *G. rostochiensis* pathogen Ro2/3 and Ro5. In: Bericht über die 57. Tagung 2006 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute, p 120. HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Irdning, Austria.
- SONG YS, SCHWARZFISCHER A, 2008: Development of STS markers for selection of extreme resistance ( $Ry_{sto}$ ) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. *Am J Pot Res* 85, 159-170.
- SONG YS, MIKOLAJEWSKI S, SCHWARZFISCHER A, 2007: cDNA-AFLP analysis for potato chip color quality after long term storage at 4°C. In: Bericht über die 57. Tagung 2006 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute, p 121. HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Irdning, Austria.
- SONG YS, HEPTING L, SCHWEIZER G, HARTL L, WENZEL G, SCHWARZFISCHER A, 2005: Mapping of extreme resistance to PVY ( $Ry_{sto}$ ) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines. *Theor Appl Genet* 111, 879-887.

# Entwicklung von Markern für die Resistenzzüchtung gegen Kraut- und Braunfäule in der Kartoffel

## Developing molecular markers for selection of resistance against late blight in potato

Friederike Trognitz<sup>1\*</sup> und Bodo Trognitz

### Abstract

Markers for two novel late blight resistance genes in potato were developed. The allele RPi-tbrM1 is from the clonal selection MF-II, and allele RPi-adgT1 is from the group andigena cultivar TPS67. Both parental cultivars are in simplex state for their respective resistance allele and by crossing using MF-II as the seed parent, a 171-progeny tetraploid mapping population was generated. The resistance genes were mapped in this population; Rpi-tbrM1 resides on chromosome XI and RPi-adgT1 on chromosome IV. Mapping was facilitated by applying markers of known map position that are syntenic across tomato and potato. Although the resistance genes could not be isolated through this approach, it was possible to detect, within reasonably short time and at modest cost, their location at sufficient proximity. We want to develop tools for marker-aided selection in any breeding population that may be raised using either of the two sources, MF-II and TPS67. Therefore, reliable and inexpensive markers are to be derived from the existing syntenic markers. One of these syntenic markers, At1g07960 from the COSII set, was chosen for further investigation. Primers amplified several alleles from chromosome XI, and these were detectable in separate following electro-

phoresis of cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS). One of these CAPS marker alleles was directly linked with the RPi-tbrM1 resistance at approximately 2 cM map distance and thus, this allele appears useful for selection purposes. Several approaches were tested to make a simple one-step PCR marker from this CAPS. The most promising results gave the KASPar assay (KBiosciences). In this assay, both the selective marker allele and all other alleles present at the marker locus are distinguished by two fluorescent dyes. Hence, within only one PCR reaction, the presence of the target allele can be detected, and in case of its absence from recombinant progenies, the absence is immediately confirmed. The new KASPar-based marker was applied to potato cultivars genetically unrelated to MF-II. Surprisingly, the marker was found in several of these cultivars even although their phenotype of susceptibility to late blight does not indicate functional resistance. Therefore, it has to find out, if the detected PCR product corresponds to the allele 2 in the MFII population.

### Keywords

Genetic map, molecular marker, *Phytophthora infestans*, resistance breeding, *Solanum tuberosum*

### Introduction

Late blight, caused by *Phytophthora infestans*, is one of the most damaging diseases of the potato. Growing resistant varieties is a valid complementation or even alternative to fungicide use in disease control. Because of the requirement of large progeny numbers in this tetraploid crop in order to obtain desired new genotypes upon recombination, selection by the genotype already at early stages of breeding would be advantageous. The more accurately desired genotypes can be detected the smaller would be the number of recombinants to be phenotyped during laborious screenings in field and greenhouse. Thus, the availability of molecular markers for many genes and traits is of high economic interest in potato breeding.

Potato geneticists already have valuable tools at hand to make markers for new alleles conferring traits of interest. Its existing genetic linkage maps (ISIDORE et al. 2003)

are among the densest and largest of the crop plants and the wealth of maps and markers developed on the tomato (as an example, see <http://solgenomics.net/>) can also be used, due to the close relationship of these solanaceous crops.

At present, only a handful of molecular markers are readily applied in potato breeding programs. These include markers for potato virus Y resistance originating in *S. stoloniferum* (ROSS 1952), for resistance to the nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* (GEBHARDT et al. 2006), and for late blight resistance genes from *S. bulbocastanum* (VAN DER VOSSEN et al. 2002, COLLTON et al. 2006). Research within the EU project „Bioexploit“ is directed toward the development and use of markers for late blight resistance and selection technology applied in potato breeding. For the success of marker assisted selection (MAS) in potato breeding programs, important features of the technology comprise the relative ease of application, great diag-

<sup>1</sup> AIT, Austrian Institute of Technology GmbH, A-2444 SEIBERSDORF

\* Ansprechpartner: Friederike TROGNITZ, [friederike.trognitz@ait.ac.at](mailto:friederike.trognitz@ait.ac.at)

nostic value of the markers (high rate of correct selection, few false negatives), and affordable implementation costs. Therefore, the aim of the work presented here has been to develop a marker system, which is robust and applicable in a wide range of breeding materials and costs significantly less than conventional phenotyping.

## Material and Methods

A biparental mapping population of 171 progeny and their parents; MF-II (*S. tuberosum* group *tuberosum*, male-sterile, of Indian descent) and TPS67 (andigena group, pollen parent, a Neotuberosum cultivar held at the International Potato Center) was phenotyped for resistance to late blight as described in TROGNITZ et al. 1998.

DNA was isolated from leaves with the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). For the construction of a framework genetic linkage map, simple sequence repeat (SSR) and single-copy, orthologous Consensus Sequence II (COSII) markers with known position on the consensus Solanum maps, were applied using protocols recommended by the developers of these markers (FEINGOLD et al. 2005; NAKITANDWE et al. 2007; PROVAN et al. 1999; WU et al. 2006; <http://solgenomics.net/>). The parental linkage maps were constructed with TetraploidMap software (HACKETT and LUO 2003).

Selected, COSII-specific primers targeting the R-gene-carrying chromosomal regions were applied to genomic DNA from both parents of the population to amplify fragments. Resulting fragments were cloned into the pSC-A-amp/kan vector (Stratagen) and up to 16 clones per parent were sequenced. The sequences of the inserts were screened for single nucleotide polymorphisms (SNPs).

### Application of the High

#### Resolution Melting assay (HRM):

Two primer combinations were used to detect the 07960-A2 allele. The PCR consisted of 5 µl of SsoFast EvaGreen supermix (BioRad), 0.4 mM of each primer in a 10-µl reaction volume. The PCR was done on a LightCycler 480 (Roche) with the settings: 3 min at 98°C and 40 cycles of 5 sec at 98°C and 5 sec at 60°C. For HRM, the cycler program was: 1 min at 98°C and 1 min at 40°C, followed by temperature rise from 55°C to 95°C in 1-sec steps of 0.2°C increase. The fluorescence was read at every step temperature and data analysis was performed with the LightCycler software.

### Application of the

#### KASPar assay (KBiosciences)

The assay consists of applying two forward primers which are specific for the SNPs, and of one common reverse primer. Here, one forward primer specific for allele 07960-A2 linked with RPi-tbrM1 (see Results) and another forward primer covering all existing alternative alleles in MFII and TPS67 at the locus 07960 were used. The SNP-specific allele detection is based on FRET, each forward primer carried one distinct fluorescence dye. PCR was performed in 5 µl KASPar assay reaction mix (KBiosciences, the mix

contains dNTPs, buffer, universal fluorescent reporting dyes and *Taq* polymerase), 0.069 µl of the assay mix (containing 12 µM of each the two forward primers and 30 µM of the reverse primer), 0.04 µl of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, and 4 µl of 5 ng DNA template. The PCR was done in a low-profile plate on a C1000 thermocycler (BioRad) set to 94°C at 15 min and 37 cycles of 10 sec at 94°C, 20 sec at 57°C, and 40 sec at 72°C. The fluorescence signal was read out on an iQ5 realtime PCR (BioRad) machine and analyzed to detect presence and absence of the target alleles. Various positive and negative samples (from potato cultivars with and without the corresponding target allele) were included as controls.

## Results and discussion

The frequencies of late blight resistant and susceptible progenies and the resistance of both parents against the 0-race indicated that each parent carries one distinct dominant R gene in simplex state. By phenotyping all progenies and the parents subsequently with different *P. infestans* isolates representing individual complex pathotypes it was possible to distinguish carriers of the R gene originating in MF-II from carriers of the TPS67-originating R gene. However, it was not possible to separate recombinants carrying both R genes from those that carried RPi-*adgT1* only. Therefore, three groups of progenies could be distinguished by the resistance to late blight. There are 53 individuals carrying RPi-tbrM1, 83 putatively containing either RPi-*adgT1* or the combination of both RPi-tbrM1 and RPi-*adgT1*, and 35 individuals that were susceptible. This corresponds to the expected figures of segregation for two unlinked, dominant genes in simplex state, in a tetraploid. In this case, one gene, denominated RPi-tbrM1 originated in parent MF-II and the other, RPi-*adgT1*, in TPS67.

By associating the markers on the linkage maps with the resistance phenotype it was found that RPi-tbrM1 is on chromosome XI and RPi-*adgT1* on IV. Both R loci appeared to reside on resistance gene „hot spots“ that were discovered earlier on these two chromosomes. Once these rough positions had been detected, fine-mapping was commenced by applying many molecular markers whose positions on these two Solanum chromosomes were known in detail from other published work. Especially many COSII markers were applied to the MF-II and TPS67 parents and groups of 5-10 progenies sharing one phenotype of resistance. PCR primers for the COSII markers were used and the amplicons produced by them were investigated for polymorphisms by applying several DNA restriction enzymes. When polymorphisms specific for either parent were found this primer-enzyme combination marker was used for genotyping all progenies of the mapping population, and the marker was mapped. With this method, it was possible to detect several markers grouped closely around the R genes' positions (*Figure 1*).

The subsequent developments were focused on a few selected, closely linked marker loci. Fragments amplified from genomic DNA of MF-II and TPS67 with COSII-derived primers (*Table 1*), were cloned and sequenced and SNPs were detected. The polymorphic COSII marker At1g07960



**Table 1: COSII markers for conversion to one-step, high-throughput markers amenable to application in screening for the RPi-tbrM1 allele conferring resistance to late blight in potato. CAPS; cleaved amplified polymorphic sequence.**

Marker name	Type	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
At3g54470_Alu	CAPS	TCCTGACTTTGGTTCTAAGCTTAGATCG	TCAAATATTAAGAAGTTGTGCTTGTCTGC
At4g32930_TasI	CAPS	TCCTCTCCTATTGGCAAGGGC	TGGACTCCCCCTTTTCATCATAC
At1g07960_Taq	CAPS	ATGGTTTGTCAAATTTTGTGTCC	AAGAGTTTGAATGTAGGGTATGAATG
At5g51700_AluI	CAPS	AGATGCCACCAGGGATTCTTTTG	AGCAGTGTGCGTATTTTCCTTTTC
At5g11550_TaqI	CAPS	TCATCTTCATCTAACACTAATTCACAGAG	ATGTCCACCACTGCCCCGACAGC

was used to develop allele-specific primers that can detect all alleles present at this locus among the two parents. Apparently all alleles at this marker locus were readily detected; two of these were present in MFII only and only one of these should be linked to the resistance. Therefore, these two alleles were mapped by genotyping the entire progeny, and one allele, tagged by a primer denominated 07960-A2, was linked in cis with the late blight resistance allele RPi-tbrM1 from MF-II.

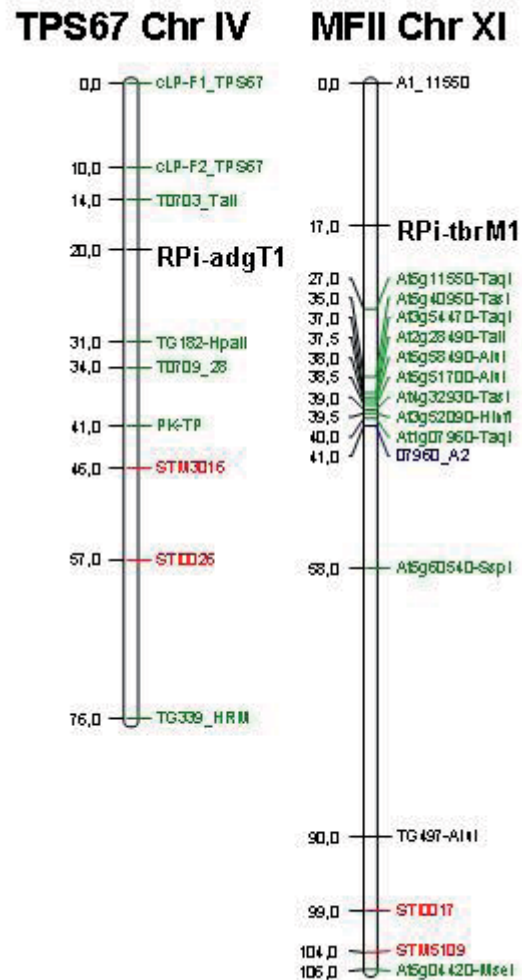
Subsequently, a molecular marker amenable to high-throughput application was to be developed based on primer 07960-A2. The search for a methodology that would combine in one step the detection of the marker and the validation that the polymerase chain reaction (PCR) was successful, with no need for further manipulation, was focused around two innovative techniques; high resolution melting (HRM) and the KBiosciences Allele-Specific PCR (KASPar). Both one-step detection methods are claimed by their developers to be easy to apply and to allow for a confirmation of successful PCR.

When HRM was applied, several alleles grouped by their specific melting temperature could be seen, but it was not possible to track the 07960-A2 allele in the progenies.

Therefore the KASPar assay (KBiosciences) was tested, the result of genotyping potato progenies by this method is shown in the bottom part of *Figure 2*. The 07960-A2 allele was clearly and undoubtedly identified in all progeny across the mapping population including the parents MF-II and TPS67. Importantly, the presence or absence of this allele was confirmed by the corresponding signal for the alternative alleles at this locus.

The KASPar assay was then applied to 146 other potato cultivars and breeding clones that lacked the MF-II background and, as a control, to a few clones that were derived from MF-II background. The 07960-A2 was, as expected, always amplified from control samples possessing this allele. Surprisingly, the 07960-A2 allele was also detected in clones unrelated to MF-II background including the cultivars Fontane, and Innovator, Agria and its descendant Sinora. The resistance to late blight of these four cultivars, as observed in multi-year evaluations in the field, ranges from very strong (Innovator) to moderate (Fontane) indicating that RPi-tbrM1 (or its homologous derivatives) can contribute to partial resistance in the field. The alternative alleles at the 07960 locus, indicative of susceptibility to late blight, were reliably detectable, thus providing for security of the KASPar assay's functionality.

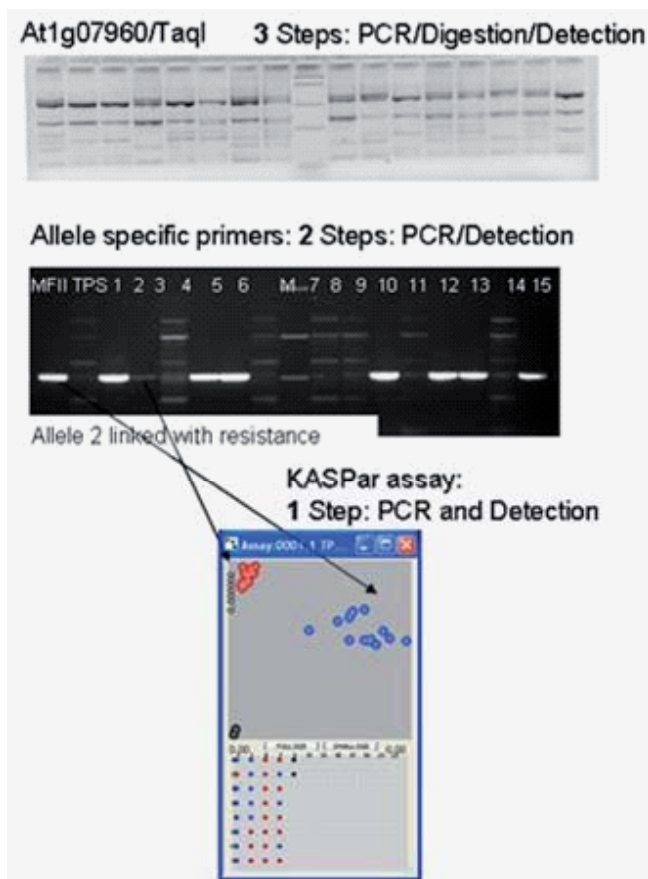
Work to develop similarly reliable and precise markers for RPi-adgT1 from potato cultivar TPS67 is still ongoing.



**Figure 1: Genetic linkage map of the chromosome IV of TPS67 and XI of MF II carrying the resistance loci (in bold)**

## Conclusions

It was demonstrated that innovative tools in Solanum bio-informatics and molecular genetics, consequently applied in association with breeding traits, can lead to the rapid identification of target genomic loci associated with traits of interest, such as resistance to late blight. Present-day innovative technology, such as the one-step allele detection system „KASPar“ is useful and sufficient to trace specific alleles at a locus; there as little as a single base exchange is sufficient for characterization. This method has potential to become a comfortable and cost-efficient tool in marker-assisted selection and plant breeding.



**Figure 2:** Schematic representation of the development of easy-to-use molecular „1-step“ markers tagging the RPi-tbrM1 gene conferring resistance to late blight. Markers based on PCR primers and genomic fragments at the COSII, At1g07960 locus, for details see text

### Acknowledgement

This work has been financed jointly by AIT and the EU (Bioexploit Project, FP6, FOOD-CT-2005-513959).

### References

COLTON LM, GROZA HI, WIELGUS SM, JIANG J, 2006: Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance

conferred by gene RB derived from a wild potato species. *Crop Sci* 46, 589-594.

FEINGOLD S, LLOYD J, NORERO N, BONIERBALE M, LORENZEN J, 2005: Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor Appl Genet* 111, 456-466.

GEBHARDT C, BELLIN D, HENSELEWSKI H, SCHWARZFISCHER J, VALKONEN J, 2006: Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor Appl Genet* 112, 1458-1464.

HACKETT CA, LUO ZW, 2003: TetraploidMap: Construction of a Linkage Map in Autotetraploid Species. 10.1093/jhered/esg066. *J Hered*, 94(4), 358-359.

ISIDORE E, OS H van, ANDRZEJEWSKI S, BAKKER J, BARRENA I, BRYAN GJ, CAROMEL B, ECK H van, GHAREEB B, DE JONG W, VAN KOERT P, LEFEBVRE V, MILBOURNE D, RITTER E, ROUPPE VAN DER VOORT J, ROUSSELLE-BOURGEOIS F, VAN VLIET J, WAUGH R, 2003: Toward a marker-dense meiotic map of the potato genome: lessons from linkage group I. *Genetics* 165, 2107-2116

NAKITANDWE, J., TROGNITZ, F., Trognitz, B. (2007) Reliable allele detection using SNP-based PCR primers containing Locked Nucleic Acid: application in genetic mapping. *Plant Methods*, 3(1), 2.

PROVAN J, POWELL W, WAUGH R, 1996: Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor Appl Genet* 92, 1078-1084.

ROSS H, 1952: Studies on mosaic resistance in the potato. In: Proceedings of the 1951 Conference on Potato Virus Disease, Lisse-Wageningen, 40-47.

TROGNITZ BR, 1998: Inheritance of resistance in potato to lesion expansion and sporulation by *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol* 47, 712-722

VAN DER VOSSSEN E, SIKKEMA A, HEKKERT BTL, GROS J, MUSKENS M, STIEKEMA W, ALLEFS S, 2002: Positional cloning of a resistance gene from *Solanum bulbocastanum* conferring race non-specific resistance to *Phytophthora infestans*. In: Wenzel G, Wulfert I (eds), Conference of the Global Initiative on Late Blight, Hamburg, Germany, pp 339.

WU F, MUELLER LA, CROUZILLAT D, PETIARD V, TANKSLEY SD, 2006: Combining bioinformatics and phylogenetics to identify large sets of single copy, orthologous genes (COSII) for comparative, evolutionary and systematic studies: A test case in the euasterid plant clade. *Genetics* 174, 1407-1420.

# Assoziationskartierung in Gerste - Ein genomweiter und Kandidatengen-Ansatz

## Association mapping in barley - a genome wide and candidate gene approach

Inge E. Matthies<sup>1\*</sup>, Stephan Weise<sup>1</sup> und Marion S. Röder<sup>1</sup>

### Abstract

Diversity Arrays Technology (DArT) markers and Simple Sequence Repeats (SSRs) were applied to investigate genetic diversity (kinship), population structure, and extent of linkage disequilibrium (LD) on a genome wide level in European barley cultivars. While DArT technology detects the presence versus absence of individual fragments, SSRs comprise a co-dominant multiallelic marker system. DArT technology enables a whole genome profiling of crops such as barley without the need of sequence information. In total, 1915 DArT markers were polymorphic and 1088 of them were already mapped. Out of these, 253 were selected every 5 cM from the linkage map and used for LD and association studies for each chromosome. Population structure was also revealed in the spring and winter subpopulations. For the total set of 190 cultivars, five groups were found. The results for population structure employing SSR analysis were compared to the results obtained with DArTs. LD studies with both random marker sets showed clear differences about extent of LD depending on the population structure (spring or winter growth habit, row number) and according to the chromosomal location. The available data will be used to elucidate significant associations for important malting and kernel quality parameters with DArT and SSR data. Furthermore, in a structural genomic approach candidate genes with impact on malting quality were investigated and association results from two of them (Catalase1 and Phospholipase D-like protein) are presented exemplarily.

### Keywords

Association genetics, candidate genes, DArT, *Hordeum vulgare*, population structure, SNP

### Einleitung

Im Rahmen des GABI-GENOBAR-Projektes werden derzeit vier verschiedene Ansätze zur Detektion von signifikanten Beziehungen zu wichtigen Malz- und Kornqualitätsparametern verfolgt: (1) SNPs (single nucleotide polymorphisms) und INDELs (Insertionen-Deletionen) aus Kandidatengen mit bekannter Funktion im Kohlenstoff- und Stickstoffme-

tabolismus sowie zufällig im Genom verteilte (2) SSR- und (3) DArT-Marker sowie (4) Illumina-Marker.

Hier werden Beispiele für Assoziationsstudien basierend auf dem (a) genomweiten Ansatz mit DArTs und (b) Ergebnisse einiger der insgesamt 32 studierten Kandidatengene vorgestellt. Catalase 1 (*Cat1*) kommt in Peroxisomen vor und repräsentiert zusammen mit Superoxid-Dismutasen (SODs) und Hydroperoxidasen einen Teil des zellulären Abwehrmechanismus, in dem alle als Radikalfänger agieren. Das Phospholipase D-like Protein (*PLD*) spielt eine Rolle beim Abbau der Zellwände im Endosperm und hat demzufolge auch einen großen Einfluss auf die Malzqualität bei Gerste (*Hordeum vulgare* L.). PLD wird durch Abscisinsäure aktiviert und katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylcholin zu Phosphorsäure.

Das Ziel dieser Untersuchungen ist das Auffinden von hochsignifikanten Assoziationen zwischen den für Hochdurchsatz-Genotypisierung entwickelten molekularen Markern und den Malz- und Braueigenschaften der Gerste.

### Material und Methoden

Von allen Kandidatengen wurden genomische Fragmente mittels PCR generiert. Die dafür verwendeten spezifischen Primer wurden basierend auf öffentlich verfügbaren Sequenzen aus NCBI-Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>) generiert. Nach Resequenzierung und Identifikation von UTR-Intron-Exon-Strukturen, Detektion vorhandener SNPs und INDELs wurden spezifische Pyrosequenzier-Marker-Assays entwickelt und die Genotypisierung von 190 Sorten durchgeführt. INDEL-Analysen erfolgten mittels Kapillarelektrophorese. Haplotypen wurden für jedes Gen in Abhängigkeit vom Polymorphiegrad definiert. Alle Methoden bzgl. DNA-Isolation, PCR-Amplifikation, Pyrosequenzierung und SNP- und INDEL-Detektion, Ermittlung der Populationsstruktur, des Kopplungsungleichgewichtes (LD, linkage disequilibrium) sowie zur Erforschung des Verwandtschaftsgrades wurden bereits bei MATTHIES et al. (2009a,b) beschrieben. Insgesamt wurden 1915 DArT-Marker bei Triticarte Pty (<http://www.triticarte.com.au>, WENZL et al. 2004) analysiert, 1088 davon sind bereits kartiert. Ein repräsentatives Set von 253 ausgewählten DArT-Markern (alle 5 cM über das gesamte Gerstengenom) sowie von 22 SSRs diente zur Ermittlung der Populationsstruktur und

<sup>1</sup> Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstraße 3, D-06466 GATERSLEBEN

\* Ansprechpartner: Inge E. MATTHIES, [matthies@ipk-gatersleben.de](mailto:matthies@ipk-gatersleben.de)

**Tabelle 1: Anzahl der DArT- und SSR-Marker für die Ermittlung der Populationsstruktur, des Kopplungsungleichgewichtes (LDs) und des Verwandtschaftsgrades sowie für die genomweiten Assoziationsstudien bei 190 Gerstensorten**

**Table 1: Number of DArT and SSR markers used for linkage disequilibrium (LD)-studies, investigation of population structure, kinship and association studies in a set of 190 barley cultivars**

Chromosom	Anzahl DArT-Marker		Anzahl SSR-Marker
1H	141	35	4
2H	197	44	5
3H	190	44	3
4H	67	21	2
5H	155	41	2
6H	138	31	3
7H	200	37	3
Gesamt	(kartiert)	(Subset, alle 5cM)	
	1088	253	22

des Verwandtschaftsgrades (*Tabelle 1*). Zufällig verteilte Marker, wie SSRs und DArTs, wurden für die Bestimmung (1) des LD, (2) der Populationsstruktur, (3) des Verwandtschaftsgrades verwendet.

Phänotypische Daten wurden aus den statistischen Jahrbüchern der deutschen Braugerstengemeinschaft und Landesortenversuchen der letzten 20 Jahre zusammengetragen und in der Datenbank MetaBrew verwaltet (WEISE et al. 2009). Insgesamt 29 Korn- und Malzqualitätsparameter wurden für die Assoziationsstudien mit genomweiten DArT-Markern und spezifischen SNPs aus den Kandidatengen bei An-

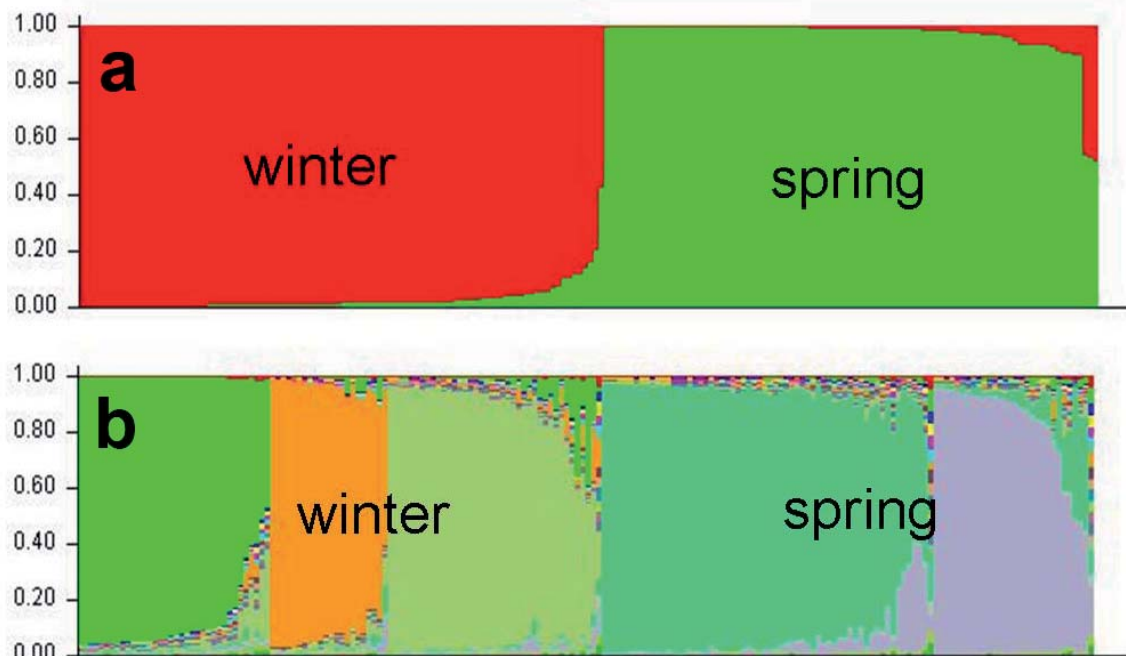
nahme des Generellen und Gemischten Linearen Modells (GLM und MLM) nach SEARLE (1987) berücksichtigt und mit TASSEL nach BRADBURY et al. (2007) verrechnet. Dazu wurde eine Pipeline zur Automatisierung der Berechnungen entwickelt (KUENNE et al. 2007).

Mit allen genomweiten Markern wurden insgesamt 190 europäische Gerstensorten untersucht, welche zu gleichen Anteilen aus Sommer- und Winterformen bestehen. Beim Kandidatengenansatz wurden Assoziationsstudien mit einer Auswahl von 140 Sorten (davon 60 Sommergersten) aus ursprünglich 342 genotypisierten Sorten durchgeführt.

## Ergebnisse und Diskussion

### *Populationstruktur und Kopplungsungleichgewicht (Linkage disequilibrium)*

Die verwendete Gerstenpopulation lässt sich klar in Winter- und Sommerformen unterteilen. Insgesamt konnten fünf Untergruppen für alle 190 Gerstensorten gefunden werden. Dabei entfallen drei Subgruppen auf die 94 zweizeiligen Sommergersten und zwei weitere Subgruppen auf die 96 Wintergersten (*Abbildung 1*). Letztere lassen sich aber nicht klar nach ihrer Zeiligkeit differenzieren. Ein hohes Kopplungsungleichgewicht ist eine wichtige Voraussetzung für das Auffinden von signifikanten Assoziationen (THORNSBERRY et al. 2001, FLINT-GARCIA et al. 2003). Dieses kann beispielsweise in einigen Regionen für das Chromosom 4H gezeigt werden (*Abbildung 2*).



**Abbildung 1: Populationsstruktur in 190 europäischen Gerstensorten ermittelt mit 22 SSR-Markern. (a) Sommer- und Winterformen (b) fünf Subpopulationen, davon entfallen drei auf Wintergerste.**

**Figure 1: Population structure of the total set of 190 European cultivars studied with 22 SSRs illustrated by bar plots. (a) Q2-SSR is differentiating winter from spring barley and (b) Q5-SSR shows the subclustering in these main groups.**

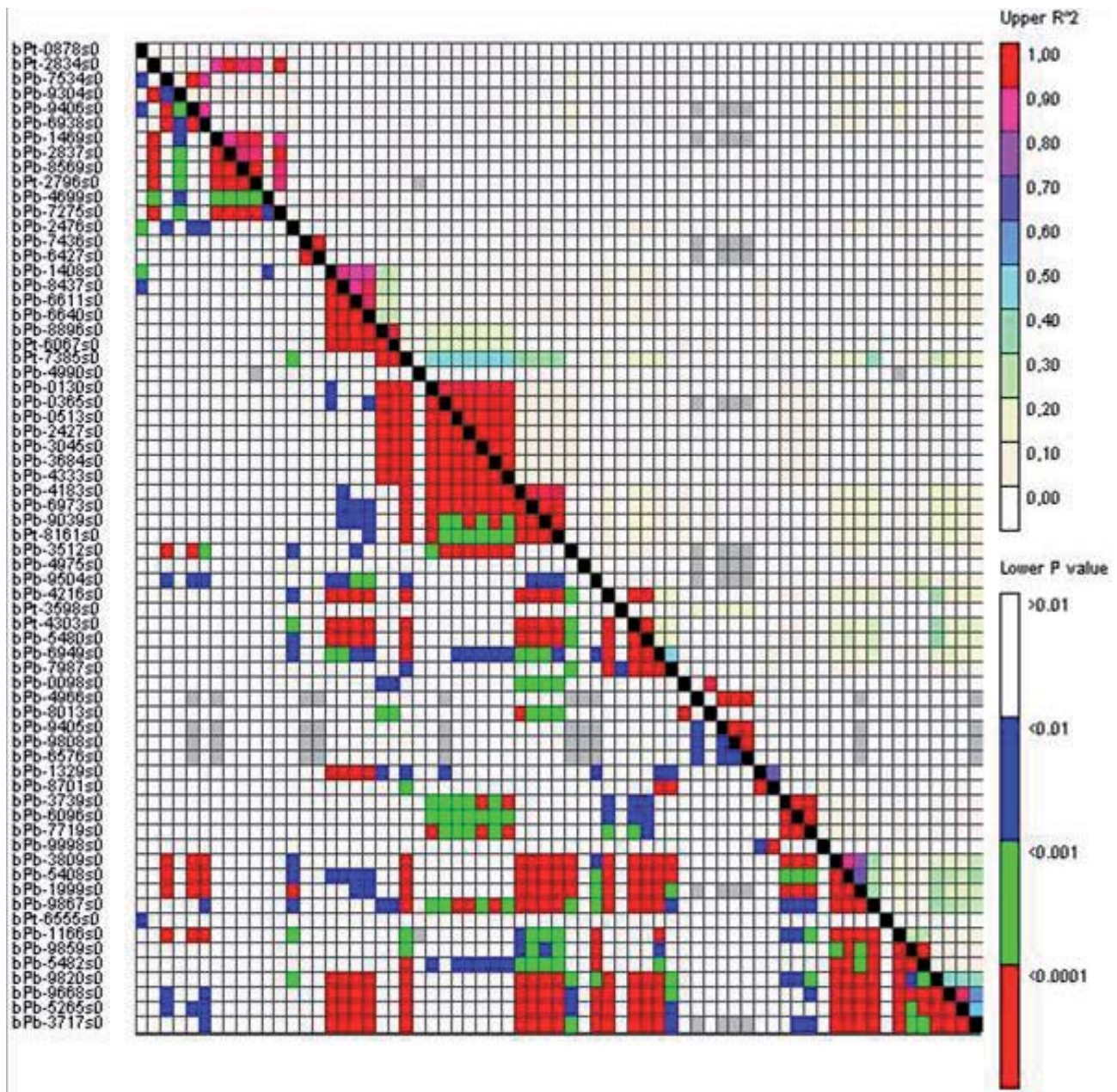


Abbildung 2: Kopplungsungleichgewicht ermittelt mit 67 DArT-Markern für alle Gerstensorten auf 4H.

Figure 2: Linkage disequilibrium on 4H determined with 67 DArT markers and all 190 barley cultivars

### Genomweite Assoziationen mit DArT-Markern

Mit allen 1915 DArT-Markern, von denen 1088 bereits kartiert sind, wurden bei Assoziationsstudien mit 29 Malz- und Kornqualitätsparametern zahlreiche signifikante Beziehungen aufgedeckt. Ausgewählte Ergebnisse für zwei Merkmale werden für das Chromosom 4H in *Abbildung 3* gezeigt. Dabei ergibt sich ein hochsignifikanter Bereich ( $P < 0,001$ ) für den Malzparameter Viskosität zwischen 61,6 und 65,3 cM sowie bei 67,9 cM sowohl für die gesamte Population unter Berücksichtigung der Populationsstruktur als auch für die Wintersubpopulation (*Abbildung 3a*). Für Tausendkornmasse (TKM) zeigen nur die Wintersorten eine signifikante Korrelation zu den DArT-Markern lokalisiert auf 4H bei 60,5 und 72,3 cM (*Abbildung 3b*).

### Assoziationsstudien in Kandidatengen

Für beide Kandidatengene *Cat1* und *PLD* wurden genomische Fragmente von 919 bp bzw. 598 bp amplifiziert und sequenziert. Jeweils zwei Hochdurchsatzmarker konnten mittels Pyrosequenzier-Assays für jedes Gen entwickelt werden. Bei der Genotypisierung von 342 Sorten konnten drei Haplotypen für *Cat1* bzw. zwei für *PLD* basierend auf den SNP-Mustern gefunden werden (*Abbildung 4*).

#### *Catalase 1 (Cat1)*

Bei *Cat1* wurden neun SNPs in vier Introns und einem Exon detektiert. Nur die synonymen SNP7 im Exon und SNP8 im benachbarten Intron konnten in Pyrosequenziermarker umgewandelt werden. Diese beiden SNPs zeigten in der

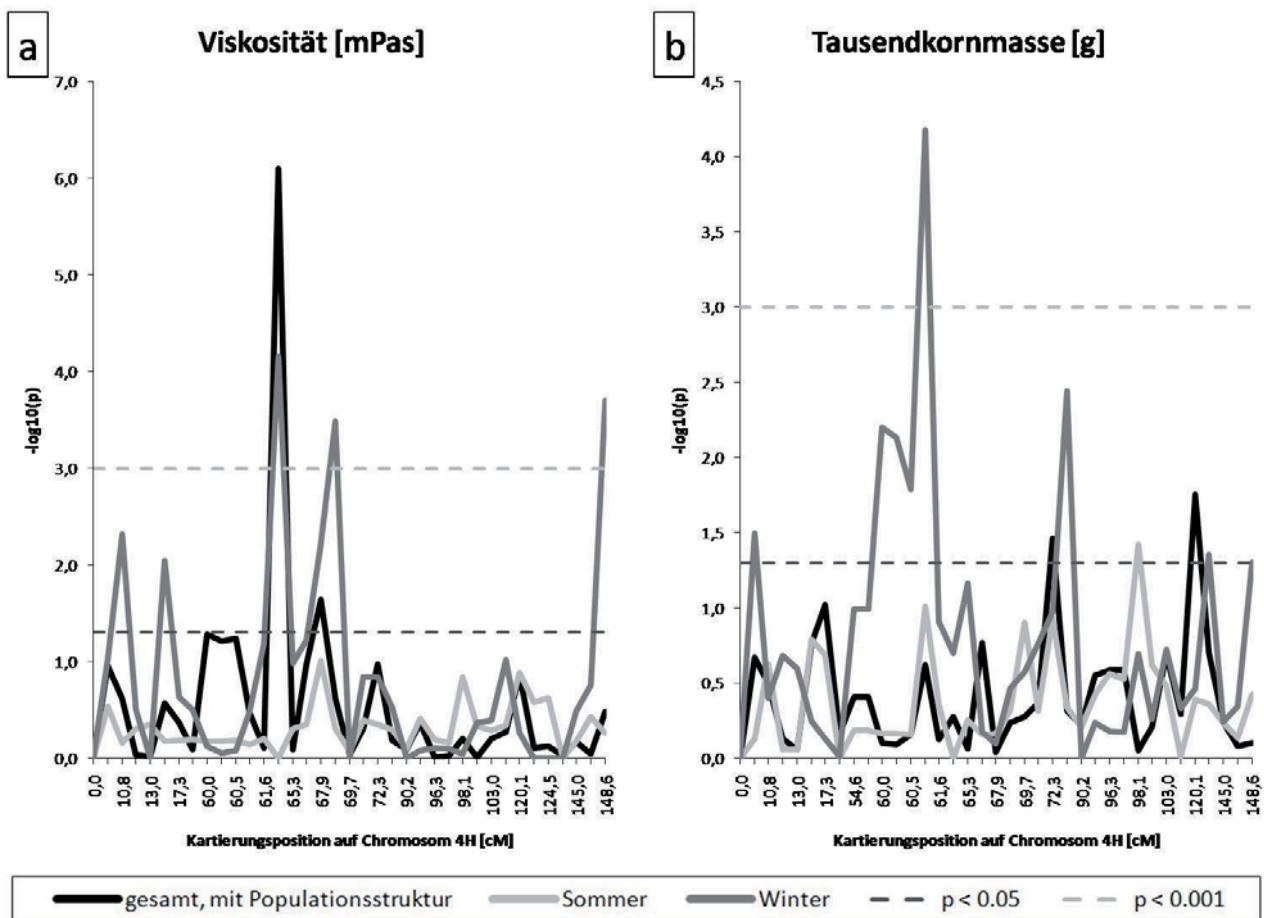


Abbildung 3: Assoziationsstudien mit DaRT-Markern auf Chromosom 4H der Gerste für die Merkmale Viskosität (a) und Tausendkornmasse (b). Insgesamt wurden 190 Gerstensorten unter Berücksichtigung der Populationsstruktur sowie die Sommer- und Winterformen getrennt verrechnet. Signifikante p-Werte sind als  $-\log_{10}$  dargestellt.

Figure 3: Association studies with DaRT markers on barley chromosome 4H. Results for the traits viscosity (a) and thousand grain weight (b) are shown for the total set of 190 cultivars with correction for population stratification and the subsets of spring and winter barley which are plotted together. Significances of the calculated p-values are shown as  $-\log_{10}$  (p-value)

Subpopulation von 60 Sommergersten signifikante Assoziationen mit den Parametern Viskosität, Endvergärungsgrad und Hektolitergewicht, was sich auch in den Ergebnissen für die Haplotypen Cat1\_H1 und Cat1\_H2 widerspiegelt (Tabelle 2). Die Varianz für Malzextrakt und Viskosität wird von Cat\_H1 zu 32% bzw. zu 9% definiert. Während Cat1\_H2 24% der phänotypischen Varianz für den Endver-

gärungsgrad erklärt, wird dieser nur zu 14% von Cat1\_H1 in den Sommersorten bestimmt.

*Phospholipase-D-like protein (PLD)*

Vom kodierenden Gen für das Phospholipase-D-like Protein (PLD) konnten jeweils ca. 300 bp vom letzten Exon und der sich anschließenden 3'UTR bei den Referenzgenotypen

Tabelle 2: Signifikante Assoziationen für SNPs und Haplotypen des *Cat1*-Kandidatengenes mit einigen Korn- und Malzqualitätsparametern bei Annahme des Generellen Linearen Modells (GLM) für alle 140 Sorten (T) bei Berücksichtigung der Populationsstruktur bzw. für jede Teilpopulation bestehend aus 60 Sommer- (S) und 80 Wintergersten (W)

Table 2: Association results for SNPs and haplotypes for the *Cat1* gene identified by the General Linear Model (GLM) for certain malting and grain quality parameters calculated either with all cultivars (T) with regard of population structure or each subset of 60 spring (S) and 80 winter barleys (W)

Parameter	SNP7	SNP8	Cat1_H1	Cat1_H2	Cat1_H3
Viskosität (8,6% mPas)	S*	S**	S*	S***	n.s.
Vergärbarer Extrakt (%)	T* S***	n.s.	S***	T*	S***
Endvergärungsgrad (%)	S**	S***	S***	S***	T*
Malzqualitätsindex (MQI)	T* S***	n.s.	T* S***	T* S*	S**
Hektolitergewicht (kg hl <sup>-1</sup> )	T* S***	S*	S***	T* S*	S**

n.s., nicht signifikant; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001

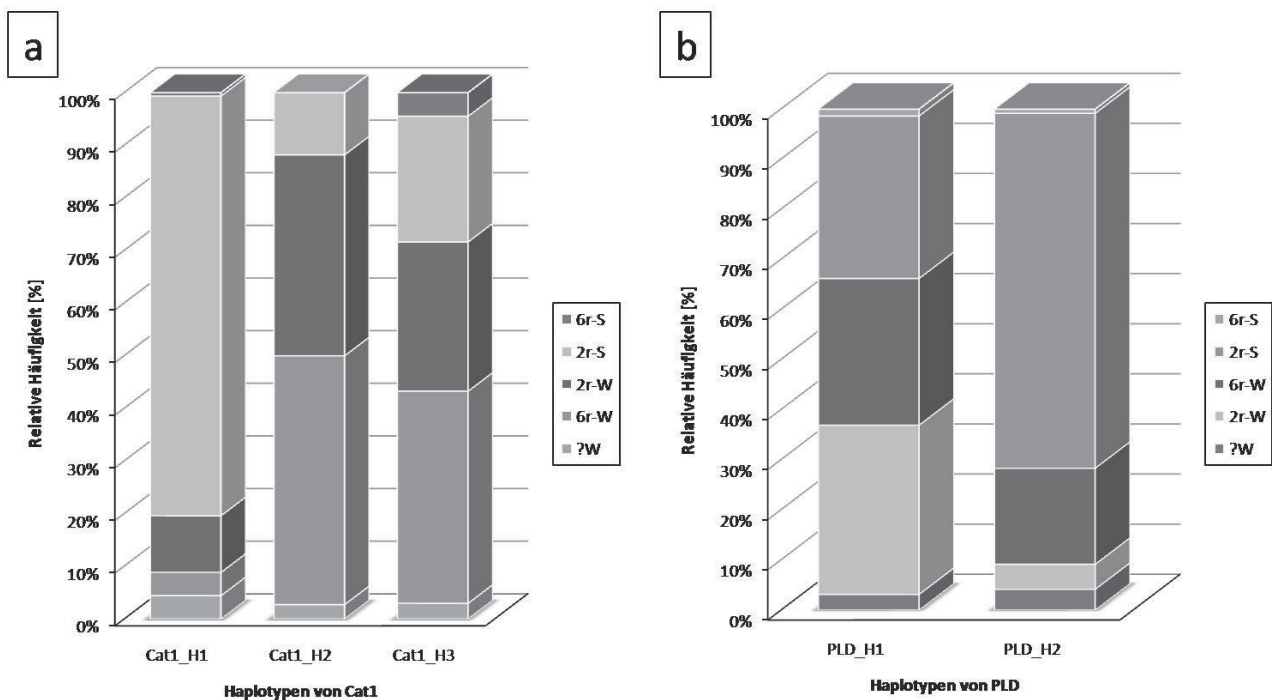


Abbildung 4: Relative Haplotypenverteilung der Kandidatengene *Cat1* (a) und *PLD* (b) in 342 Gerstensorten (S, Sommergersten; W, Wintergersten; 2r, 2-zeilig; 6r, 6-zeilig; ?, Wintergersten mit unbekannter Zeiligkeit)

Figure 4: Haplotype distribution of the genes *Cat1* (a) and *PLD* (b) in a set of 342 barley cultivars related to the population substructure according to growth habit and row number (S, spring; W, winter; 2r, two-row; 6r, six-row; ?, winter barleys with unknown row-number)

sequenziert werden. In letzterer wurden vier SNPs detektiert und zwei davon konnten in Pyrosequenziermarker umgewandelt werden. Assoziationsstudien unter Annahme des GLM zeigten signifikante Beziehungen entweder mit allen 140 Sorten bzw. in den Subpopulationen von 60 Sommer- oder 80 Wintersorten. Der Haplotyp PLD\_H2 hat einen signifikanten Einfluss auf Malzextrakt, Farbe des Malzes sowie dem MQI und erklärt entsprechend 27%, 23% bzw. 26% der phänotypischen Varianz dieser Merkmale innerhalb der Sommersorten. Hoch signifikante Assoziationen ( $p < 0,001$ ) werden jeweils für SNP1 und SNP3 mit den Merkmalen Endvergärungsgrad, Malzextrakt, Friabilimeter und MQI detektiert werden. Beide Marker erklären bis zu 30% der phänotypischen Varianz für diese Merkmale (Tabelle 3).

Beide Kandidatengene, *Cat1* (Steptoe  $\times$  Morex) und *PLD* (OWB), konnten am distalen Ende des langen Arms vom Gersten-Chromosom 7H kartiert werden.

## Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit Hilfe der entwickelten funktionalen Marker aus dem genomweiten und Kandidatengenansatz lässt sich die Züchtung von Braugersten mit verbesserten Korn- und Malzqualitätseigenschaften durch markergestützte Selektion erheblich beschleunigen. Durch Korrelation der erhaltenen molekulargenetischen Daten mit den sortenspezifischen Malzeigenschaften können kausale Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp gefunden werden. Dabei kann

Tabelle 3: Signifikante Assoziationen für SNPs und Haplotypen für das Phospholipase D-like Protein (PLD) kodierende Gen mit einigen Korn- und Malzqualitätsparametern bei Annahme des Generellen Linearen Modells (GLM) für alle 140 Sorten (T) bei Berücksichtigung der Populationsstruktur bzw. für jede Teilpopulation bestehend aus 60 Sommer- (S) und 80 Wintergersten (W)

Table 3: Association results and significant SNPs and haplotypes of the Phospholipase D-like Protein (PLD) gene for some chosen malting quality parameters calculated either with all cultivars (T) with regard of population structure or each subset of 60 spring (S) and 80 winter barleys (W)

Parameter	SNP1	SNP3	PLD_H1	PLD_H2
Farbe (EBC)	T** S***	T** S***	T* S*	T** S***
Extrakt (%)	S*** W*	S*** W*	W*	S***
Endvergärungsgrad (%)	T** S***	T** S***	T* S**	n.s.
Friabilimeter (%)	S*** W**	S*** W**	W**	S*
Verzuckerungszahl VZ45 (%)	S**	S**	n.s.	n.s.
Malzqualitätsindex (MQI)	S*** W**	S*** W**	S* W**	S*** W**

n.s., nicht signifikant; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$

gezeigt werden, wie hoch der genetische Beitrag zu einem Malzmerkmal sein kann, was nicht nur für Züchter, sondern auch für die Malz- und Brauindustrie von Interesse ist. Durch Entwicklung neuer Gerstensorten mit verbesserten physiologischen Leistungen wird eine weitere Optimierung des Zucht- und Mälzungsprozesses ermöglicht.

## Danksagung

Wir danken Ellen Weiß und Manja Franke für die technische Durchführung der SNP- und SSR-Studien, der SU Biotec und der KWS-Lochow AG für die Mitarbeit bei der Genotypisierung einiger Kandidatengene, sowie Triticarte für die DArT-Analysen. Dem BMBF wird für die Finanzierung der beiden GABI-Projekte MALT (0313125A) und GENOBAR (0315066C) herzlich gedankt.

## Literatur

- BRADBURY PJ, ZHANG Z, KROON DE, CASSTEVENS RM, RAMDOSS Y, BUCKLER ES, 2007: TASSEL Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23: 2633-2635.
- FLINT-GARCIA SA, THORNSBERRY JM, BUCKLER ES, 2003: Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54:357-374.
- KUENNE C, GROSSE I, MATTHIES IE, SCHOLZ U, SRETENOVIC-RAJICIC T, STEIN N, STEPHANIK A, STEUERNAGEL B, WEISE S, 2007: Using data warehouse technologies in crop plant bioinformatics. *J Integr Bioinformatics* 4: 88.
- MATTHIES IE, WEISE S, RÖDER MS, 2009a: Association of haplotype diversity in the  $\alpha$ -amylase gene *amyl1* with malting parameters in barley. *Mol Breed* 23: 139-152.
- MATTHIES IE, WEISE S, FÖRSTER J, RÖDER MS, 2009b: Association mapping and marker development of the candidate genes (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohydrolase and (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -xyloendohydrolase 1 for malting quality in barley. *Euphytica* 170: 109-122.
- SEARLE, 1987: *Linear models for unbalanced data*. Wiley, New York.
- THORNSBERRY JM, GOODMAN MM, DOEBLY J, KRESOVICH S, NIELSEN D, BUCKLER ES, 2001: Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nat Genet* 28:4673-4680.
- WEISE S, SCHOLZ U, RÖDER MS, MATTHIES IE, 2009: MetaBrew: A comprehensive database of malting quality traits in brewing barley. *Barley Genet Newsl* 39:1-4.
- WENZL P, CARLING J, KUDRNA D, JACCOUD D, HUTTNER E, KLEINHOF A, KILIAN A, 2004: Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proc Natl Acad Sci* 101: 9915-9920.



# Genetische Analyse neuer Resistenzressourcen für Anthraknose-Resistenz in der Blauen Süßlupine (*Lupinus angustifolius* L.) und die Entwicklung molekularer Marker

## Sources of resistance and development of molecular markers for anthracnose resistance in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.)

Brigitte Ruge-Wehling<sup>1</sup>, Christoph Thiele<sup>2</sup>, Regine Dieterich<sup>2</sup>, Fred Eickmeyer<sup>2</sup> und Peter Wehling<sup>1</sup>

### Abstract

Anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum lupini*, is among the most important lupin diseases. For the time being, fungicide application and seed treatment are necessary to prevent *C. lupini* infection in the field. Alternatively, resistance genes directed to *C. lupini* may be identified and used in this lupin species. To this end, a marker-assisted approach was followed to transfer the resistance gene *Lanr1* from Australian into German lupin germplasm. Additionally, genebank accessions were screened for novel anthracnose resistances by use of a reliable and standardized resistance test. Three accessions were identified which displayed strong resistance to *C. lupini*. One of them (Bo7212) was tested in the field and strong resistance could be confirmed. From the novel resistance resources, segregating mapping populations are being developed for genetic and molecular marker analysis. Greenhouse tests of two F<sub>2</sub> mapping populations indicated a dominant inheritance of the resistance. The reaction of Bo7212 observed under infection pressure in field trials was different from that of the Australian cv. Tanjil. This difference as well as the divergent pedigrees of the two entries let us assume that Bo7212 carries an anthracnose resistance gene different from *Lanr1* in Tanjil. For mapping purposes, 150 gene-based molecular markers were kindly provided by M. Nelson (University of Western Australia, Perth). Sequence information of the *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and *Pisum sativum* model genomes will be used to develop closely linked markers for anthracnose resistance in narrow-leafed lupin.

### Keywords

*Colletotrichum lupini*, narrow-leafed lupin, marker development, resistance

### Einleitung

Unter den in Deutschland anbauwürdigen großkörnigen Leguminosen sticht die Lupine mit durchschnittlich 30-45% Rohprotein im Samen heraus, das dank des Anteils an den

essenziellen Aminosäuren Tryptophan und Methionin als ernährungsphysiologisch hochwertig gilt. Als Stickstoff-Fixierer und Pfahlwurzler hat die in Deutschland fast ausschließlich angebaute Blaue Lupine (*Lupinus angustifolius* L.) einen guten Vorfruchtwert; sie kann dank ihres ausgedehnten Wurzelsystems besonders gut die im Boden vorhandenen Phosphate als Nährstoff akquirieren und auch auf leichteren, trockeneren Standorten gedeihen. Das Samenprotein der Blauen Süßlupine ist wegen seiner günstigen Eigenschaften nicht nur für Futterzwecke, sondern auch im Lebensmittelbereich einsetzbar, wenn es etwa um die Substitution von Soja-Eiweiß oder tierischem Eiweiß in Back-, Teig- und Wurstwaren, Saucen, Eiscremes, Süßwaren usw. geht. Trotz der agrarökologisch und ernährungsphysiologisch interessanten Eigenschaften dieser Fruchtart ist ihre Anbaufläche in Deutschland in den vergangenen Jahren deutlich geschrumpft, und mittlerweile gibt es nur noch einen deutschen Sortenzüchter, der sich mit dieser Kulturart befasst.

Eine wichtige Voraussetzung für die gesicherte Weiterverarbeitung der proteinhaltigen Körner ist die Ernte von gesundem Erntegut, um eine optimale Proteinausbeute für die Industrie zu erzielen. Allerdings wird die Blaue ebenso wie die Weiße und die Gelbe Lupine von dem pilzlichen Erreger der Anthraknose, *Colletotrichum lupini*, befallen, der Ertragseinbußen bis hin zum Totalverlust verursachen kann. Diese Krankheit führte dazu, dass der Anbau der besonders anfälligen Gelben und Weißen Lupinen ab Mitte der 1990er Jahre hierzulande praktisch zum Erliegen kam und durch den Anbau der vergleichsweise toleranteren Blauen Lupine abgelöst wurde. Allerdings erweisen sich bei künstlicher Inokulation mit dem Erreger auch die in Deutschland angebauten Sorten der Blauen Lupine, die vornehmlich aus demselben genetischen Pool stammen, als anfällig gegen Anthraknose (RUGE-WEHLING, unveröff.).

Bislang konnte ein Resistenzgen, *Lanr1*, in der australischen Sorte Tanjil identifiziert werden (YANG et al. 2004). Die durch dieses Gen bedingte Resistenz wird dominant vererbt und wird mit Hilfe eng gekoppelter Marker (YOU et al. 2005) in australischen Züchtungsprogrammen bereits gezielt genutzt. Als ebenfalls resistent wird die australische Sorte

<sup>1</sup> Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, D-18190 GROSS LÜSEWITZ

<sup>2</sup> Saatzucht Steinach, Station Bornhof, Klockower Str. 11, D-17219 BOCKSEE

\* Ansprechpartner: Dr. Brigitte RUGE-WEHLING, brigitte.ruge-wehling@jki.bund.de

Mandelup beschrieben (YANG et al. 2008). Ob in dieser Sorte ein anderer Resistenzfaktor vorliegt als in Tanjil, ist noch nicht geklärt. Ziel unserer Arbeiten ist die Identifizierung und genetische Analyse neuer Resistenzen gegenüber Anthraknose sowie die Entwicklung molekularer Marker, die in 'Smart Breeding'-Ansätzen zur Beschleunigung des Züchtungsfortschritts in hiesigem Zuchtmaterial der Blauen Lupine eingesetzt werden können.

## Material und Methoden

### Pflanzenmaterial

Insgesamt 13 Sorten (Arabella, Bolivio, Bora, Bordako, Boregine, Boruta, Borweta, Haagena, Haags Blaue, Mandelup, Polonez, Tanjil, Vitabor), 15 Zuchtstämme der Saatzucht Steinach GmbH sowie 26 Genbankakzessionen standen für den Gewächshaus-Resistenztest zur Verfügung. Im Feldtest 2007 wurden die Versuchsglieder Tanjil, Arabella, Bo7212 und Bo3533 getestet, im Jahr 2009 ebenfalls Bo7212, Tanjil und Arabella, sowie Mandelup, Metel-1 und die Genbankakzession PI07014.

Die genetische Analyse der Resistenz wurde an Hand von zwei F<sub>2</sub>-Kartierungspopulationen durchgeführt, die auf Kreuzungen der anfälligen Sorte Arabella bzw. Haags Blaue mit dem Resistenzdonor Bo7212 zurückgehen.

### Resistenztests

Für den Gewächshausresistenztest wurde der Stamm BBA70358 des Pilzes *Colletotrichum lupini* var. *setosum* verwendet. Die Freilandversuche erfolgten mit einem Gemisch von insgesamt fünf Stämmen (BBA70400, BBA70397, BBA70358, BBA70385, BBA71238). Das Pathogen wurde freundlicherweise von H. I. Nirenberg (ehemals Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, BBA) zur Verfügung gestellt.

Der Gewächshausresistenztest wurde nach YANG et al. (2004) durchgeführt. Die Pflanzen wurden mit einer Konidiensuspension von 10<sup>5</sup> Konidien ml<sup>-1</sup> inokuliert. Nach 10-14 Tagen erfolgte die Bonitur. Symptomfreie Pflanzen, d.h. solche ohne Konidienlager im Stängelbereich, wurden als resistent, Pflanzen mit stark verdrehten Stängeln und Konidienlagern am Stängel als anfällig eingestuft.

Die Freilandversuche wurden in 2007 und 2009 in Bocksee (25 Bodenpunkte) und Groß Lüsewitz (47 Bodenpunkte) als randomisierte Blockanlagen in zweifacher Wiederholung durchgeführt. Zur Inokulation wurden mit *C. lupini* inkubierte Samen (15 Samen pro Reihe) der Sorte Arabella zwischen die Reihen der Versuchsglieder mit der Hand ausgelegt; dies erfolgte ca. 4 vier Wochen nach der Aussaat der Versuchsglieder. Die Samen von Arabella waren zuvor für 4 h in einer Konidiensuspension von 10<sup>5</sup> Konidien ml<sup>-1</sup> inkubiert und anschließend getrocknet worden. Die Bonitur erfolgte zu den drei Zeitpunkten Jungpflanzenstadium, Blüte und frühes Hülsenstadium. Es wurde eine qualitative Bonitur jeder Einzelpflanze in symptomfrei oder Stängel-, Blatt- bzw. Hülsenbefall vorgenommen. Der LSD-Test wurde mit Hilfe des Programms PLABSTAT (UTZ 2005) durchgeführt.

### Molekulare Marker

Die Sequenzinformation zu den PCR basierten *L. angustifolius* Markern (NELSON et al. 2006) wurde freundlicherweise von M. Nelson, University of Western Australia, Perth, zur Verfügung gestellt. Die Primer-Sequenzinformation zu den *Medicago-truncatula*-Markern wurde der Datenbank *mtgenome* (<http://www.medicago.org/genome/map.php>) entnommen. Mit Hilfe der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/>) wurden EST-Sequenzen aus *Lotus japonicus* in das Software-Programm SSRIT (<http://www.gramene.org/gramene/searches/ssritool>) zur Suche nach SSR Sequenzmotiven übertragen. Zur Primerentwicklung für die ESTs aus *L. japonicus* wurde die Software Prime3 (Rozen and Skaletsky 2000) verwendet. Die Primerinformation zur Etablierung von Markern aus *Pisum sativum* entstammt ebenfalls einer öffentlich zugänglichen Datenbank (<http://bioweb.abc.hu/cgi-mt/pisprim/pisprim.pl>).

Die PCR zur Darstellung der STS und SSR Marker aus *L. angustifolius*, *L. japonicus*, *P. sativum* bzw. *M. truncatula* wurde mit 50-100 ng genomischer DNA durchgeführt. Die Prä-PCR-Reaktion enthielt 1× Reaction Puffer (Qiagen), 200 µM dNTPs, 5 pmol Primer und 0,5 U *Taq* DNA-Polymerase (Qiagen). Die PCR-Produkte wurden in 2,5% Agarosegelen mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung oder in 10% Polyacrylamidgelen mit anschließender Silberbromid-Färbung nach BUDOWLE et al. (1991) aufgetrennt.

## Ergebnisse und Diskussion

### Identifizierung neuer Resistenzquellen

Das Resistenz-Screening im Gewächshaus zeigte, dass alle 11 untersuchten deutschen bzw. europäischen Sorten als hoch anfällig einzustufen sind. Nur die beiden australischen Sorten Tanjil und Mandelup zeigten Symptombfreiheit. Unter den insgesamt 15 getesteten Zuchtlinien erwiesen sich zwei (Bo7212, Metel-1) als resistent. Als resistent wurde auch die Genbankakzession PI07014 eingestuft. Als vollständig anfällig wurden 12 Zuchtlinien eingestuft. Lediglich die Linie Bo3533 erwies sich als toleranter Typ mit vereinzelt Läsionen im Bereich des infizierten Stängels.

In den Jahren 2007 und 2009 wurden ausgewählte Sorten und Zuchtlinien im Feld unter künstlichen Infektionsbedingungen getestet (*Abbildung 1*). Den signifikant stärksten Befall zeigte die Zuchtlinie Bo3533 mit fast 80% befallenen Pflanzen in Groß Lüsewitz 2007. Aufgrund ihrer hohen Anfälligkeit wurde diese Linie 2009 nicht mehr getestet. Auch die im Gewächshaus als potenziell resistent eingestufte Linie Metel-1 konnte dem im Feld über einen Zeitraum von mehreren Wochen anhaltenden Befallsdruck nicht standhalten und reagierte mit starkem Anthraknose-Befall. Die Genbankakzession PI07014 erwies sich als stark vernalisationsbedürftig (ca. 4 Wochen bei 4°C). Da insgesamt nur eine Wiederholung mit 213 Pflanzen dieser Akzession vernalisiert worden war, konnten die übrigen Parzellen aufgrund des vegetativ verharrenden Entwicklungsstadiums nicht in die Auswertung einbezogen werden. Tanjil und Mandelup, die unter australischen Anbaubedingungen als resistent eingestuft werden, erwiesen sich unter den mecklenburgischen Klimaverhältnissen mit 30-50% befallenen Pflanzen als

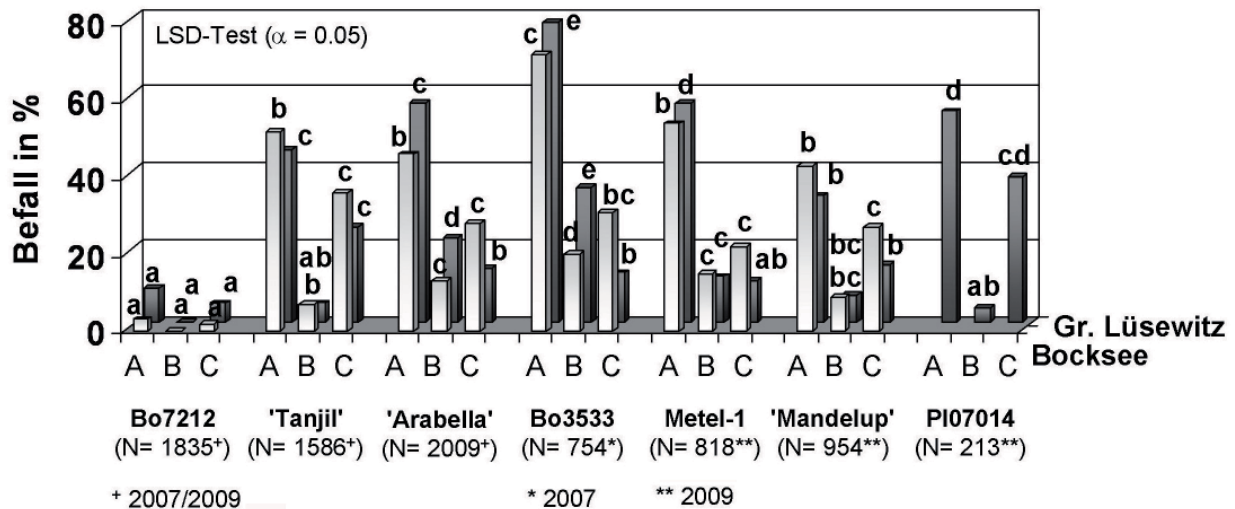


Abbildung 1: Freilandversuche zur Resistenz gegenüber Anthraknose an zwei Standorten über zwei Jahre (2007, 2009) bzw. einjährig in 2007 oder 2009. Signifikante Unterschiede im LSD-Test sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben dargestellt. (A, Gesamtanzahl infizierter Pflanzen; B, infizierte Pflanzen ohne Hülsenbildung; C, infizierte Pflanzen mit ausschließlich Hülsenbefall)

Figure 1: Field tests for anthracnose resistance at two locations and two years (2007, 2009) or annually at 2007 or 2009. Statistically significant differences are denoted by different lower case letters. (A, total amount of infected plants; B, infected plants without pods; C, pods infested only)

anfällig. Insbesondere Tanjil war im zweijährigen Feldversuch durch einen hohen Befall der Hülsen gekennzeichnet. Im Gegensatz zu den heißen und trockenen Sommern in Australien waren in unserem Feldversuch insbesondere im Jahr 2009 die Monate Juni und Juli mit bis zu 50 mm Niederschlag je Woche an beiden Versuchsorten eher feucht und kühl. Unter solchen Bedingungen verzögert sich häufig die Hülsenreife, und der Pilz kann sich auf der Hülse ausbreiten. Im Vergleich zu den übrigen sechs Versuchsgliedern zeigte sich die Zuchtlinie Bo7212 an den Versuchsorten Groß Lüsewitz und Bocksee über beide Versuchsjahre als signifikant weniger befallen.

### Kartierungspopulationen

Kreuzungen der anfälligen deutschen Sorten Haags Blaue und Arabella mit dem Resistenzdonor Bo7212 waren die Basis zum Aufbau von spaltenden Kartierungspopulationen. Der  $F_1$ -Charakter der Kreuzungsnachkommen wurde mittels molekularer Marker überprüft (RUGE-WEHLING et al. 2009).  $F_1$ -Kreuzungsnachkommen wurden unter isolierten Bedingungen geselbstet und die resultierenden  $F_2$ -Familien für die genetische Analyse und Suche nach molekularen Resistenzmarkern im Lupinengenom verwendet. Die Spaltungsverhältnisse von resistenten und anfälligen Pflanzen in den  $F_2$ -Familien 1021/1 und 1014/1 waren jeweils mit

Table 1: Segregation of anthracnose resistance in two  $F_2$  mapping populations

$F_2$ Familie	Eltern (anf. $\times$ res.)	Anzahl Individuen			$\chi^2_{3:1}$
		Gesamt	Resistent	Anfällig	
1021/1	Haags Blaue $\times$ Bo7212	114	79	35	2,0
1014/1	Arabella $\times$ Bo7212	133	100	33	0,003

Table 2: Verwendete Markerressourcen

Table 2: Used marker resources

Ressource	Anzahl Marker	
	Gesamt	Etabliert
<i>Lupinus angustifolius</i>	105	100
<i>Medicago truncatula</i>	30	30 <sup>1</sup>
<i>Lotus japonicus</i>	100	72
<i>Pisum sativum</i>	63	60

<sup>1</sup> z.T. multiple Fragmentmuster

einem 3:1-Verhältnis vereinbar und weisen somit auf einen monogenen und dominanten Erbgang der Anthraknose-Resistenz hin (Tabelle 1).

Da der Markerpolymorphismus in Zuchtmaterial der Blauen Lupine begrenzt ist, werden zurzeit zwei weitere Familien analysiert, die auf die Kreuzung des Resistenzdonors mit einer Genbankakzession als Rezipient zurückgehen.

### Molekulare Marker

Als Markerressourcen standen Primerinformationen aus vier verschiedenen Leguminosengenomen zur Verfügung (Tabelle 2). Das Screening auf Markerpolymorphismus wurde anhand der Eltern der Kartierungspopulationen durchgeführt. Im Gegensatz zu den meist kodominant auszuwertenden Markern aus der genetischen Karte von *L. angustifolius* (NELSON et al. 2006) und aus dem *P. sativum*-Genom (siehe z.B. Marker PS30 in Abbildung 2) zeigen die von *M. truncatula* bzw. *L. japonicus* abgeleiteten Marker fast ausschließlich dominant-rezessiven Erbgang (s. z.B. LJM7, Abbildung 2). Polymorphe Marker werden zurzeit für alle Individuen der Kartierungspopulation 1014/1 genotypisiert und auf eine mögliche Kopplungsbeziehung zur Resistenz analysiert.

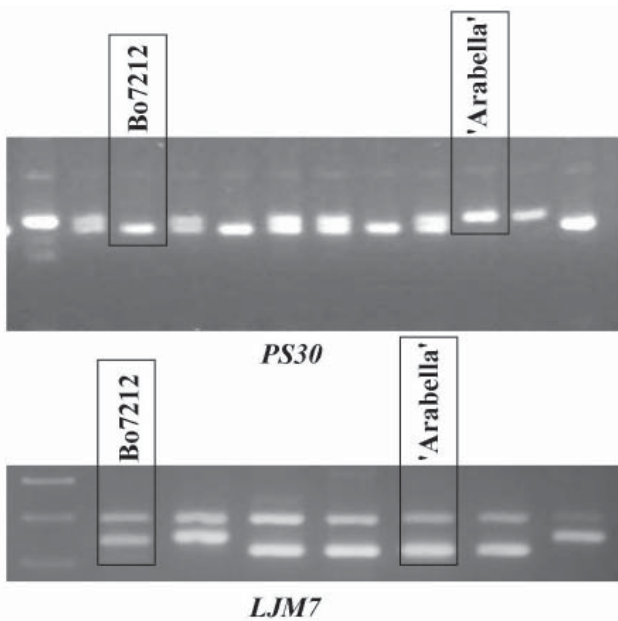


Abbildung 2: Polymorphe Marker aus den Genomen von *Pisum sativum* (oben) und *Lotus japonicus* (unten)

Figure 2: Polymorphic markers from *Pisum sativum* (above) and *Lotus japonicus* (below)

Das einzige bislang beschriebene Resistenzgen gegen Anthraknose in der Blauen Süßlupine ist *Lanr1* aus der Sorte Tanjil (YANG et al. 2004). In vorliegender Studie wird gezeigt, dass auch die deutsche Zuchtlinie Bo7212 über Anthraknoseresistenz verfügt, deren Ausprägung unter deutschen Anbauverhältnissen jene von Tanjil deutlich übersteigt. Die unterschiedliche Provenienz von Bo7212 und Tanjil und die unterschiedliche Resistenzprägung in diesen beiden Resistenzquellen unter Freilandbedingungen legen die Vermutung nahe, dass es sich um genetisch verschiedene Resistenzen handeln könnte. Zurzeit laufen Alleliekreuzungen zwischen Bo7212 und Tanjil, um zu prüfen, ob unterschiedliche Resistenz-Genorte in den beiden Resistenzquellen involviert sind. Ergänzend wird angestrebt, durch molekulare Markeranalyse die Zuordnung der Resistenzen zu Kopplungsgruppen zwischen Bo7212 und Tanjil zu vergleichen, um zusätzliche Information zur Identität der beteiligten Resistenzgene zu erhalten.

## Danksagung

Das Projekt wurde aus Mitteln des BMELV-Programmes zur Innovationsförderung (Förderkennzeichen: 28-1-41.028-06) gefördert. Frau Anne Klamroth danken wir für die statistische Auswertung der Freilandresistenzdaten.

## Literatur

- BUDOWLE B, CHAKRABORTY R, GIUSTIAM, EISENBERG AJ, ALLEN RC, 1991: Analysis of VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48, 137-144.
- NELSON MN, PHAN HTT, ELLWOOD SR, MOOLHUIJZEN PM, HANE J, WILLIAMS A, O'LONE CE, FOSU-NYARKO J, SCOBIE M, CAKIR M, JONES MGK, BELLGARD M, KSIŹKIEWICZ M, WOLKO B, BARKER SJ, OLIVER RP, COWLING WA, 2006: The first gene-based map of *Lupinus angustifolius* L. - location of domestication genes and conserved synteny. *Theor Appl Genet* 113, 225-238.
- ROZEN S, SKALETSKY HJ, 2000: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds.), *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology*, 365-386. Humana Press, Totowa, NJ.
- RUGE-WEHLING B, DIETERICH R, THIELE C, EICKMEYER F, WEHLING P, 2009: Resistance to anthracnose in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.): sources of resistance and development of molecular markers. *J Kulturpfl* 61, 62-65.
- UTZ HF, 2005: PLABSTAT. Ein Computerprogramm zur statistischen Analyse von Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik. Universität Hohenheim, Stuttgart.
- YANG H, BOERSMA JG, YOU M, BUIRCHELL BJ, SWEETINGHAM MW, 2004: Development and implementation of a sequence-specific PCR marker linked to a gene conferring resistance to anthracnose disease in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Mol Breed* 14, 145-151.
- YANG HD, RENSCHAW D, THOMAS G, BUIRCHELL B, SWEETINGHAM M, 2008: A strategy to develop molecular markers applicable to a wide range of crosses for marker assisted selection in plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Mol Breed* 21, 473-483.
- YOU M, BOERSMA G J, BUIRCHELL B J, SWEETINGHAM MW, SIDDIQUE KHM, HANG H, 2005: A PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupin breeding. *Cell Mol Biol Lett* 10, 123-134.

## Entwicklung molekularer Marker für Schwarzrostresistenz in Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne* L.) und ihre Nutzung in Züchtungsprogrammen

### Development of molecular markers for stem-rust resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and their utilisation in breeding programmes

Katrin Beckmann<sup>1\*</sup>, Fred Eickmeyer<sup>2</sup>, Hans Lellbach<sup>1</sup>,  
Franz Xaver Schubiger<sup>3</sup>, Stephan Hartmann<sup>4</sup> und Peter Wehling<sup>1</sup>

#### Abstract

A detached-leaf test for resistance of perennial ryegrass to stem rust has been developed, which is easy to use and gives the opportunity of a stem-rust evaluation independent of environment and climatic conditions. Using this test, a monogenic, dominantly inherited resistance to stem rust in *Lolium perenne* was found and characterised. Correlation coefficients obtained for infestation scores in independent tests and with plants of varying age indicated satisfactory robustness of the test procedure and stage-independency of the resistance. Reaction to different inocula of the pathogen indicated a broad effectiveness of the resistance. Analysis with genomic resistance gene analogs and simple sequence repeat markers identified three markers which were linked to the resistance gene. Two flanking markers were mapped 2.6 and 6.7 cM to the resistance gene and may be used for selection. Utilisation of the markers in breeding programmes is discussed.

#### Keywords

Molecular markers, perennial ryegrass, *Puccinia graminis*, SSR, resistance, RGA

#### Einleitung

*Lolium*-Arten gehören zu den wirtschaftlich wichtigsten Gräsern in Europa. Die europäische Saatgutproduktion erfolgt in klimatisch besonders geeigneten Regionen. Auch in Deutschland wird Gräseraatgut produziert. Schwarzrost, verursacht durch *Puccinia graminis* ssp. *graminicola*, stellt zunehmend ein Problem in der Grassamenproduktion Deutschlands dar. Höhere Sommertemperaturen und mildere Winter als Folge des Klimawandels haben die Ausbreitung und Befallsstärke von Schwarzrost in Vermehrungsbeständen in den letzten Jahren stark ansteigen lassen. Infektionen, die zu hohen Ertragsausfällen und zu verminderter

Qualität des Erntegutes führen, sind auf Grund fehlender resistenter Sorten nur durch kostenintensive prophylaktische Fungizidmaßnahmen zu verhindern. Der damit sinkende Deckungsbeitrag der Grassamenproduktion veranlasst viele Landwirte, auf den Anbau anderer Kulturarten auszuweichen. Auf Grund der Witterungsabhängigkeit der Schwarzrostentwicklung und damit einhergehender saisonaler Unterschiede im Infektionsdruck ist es nicht in jedem Jahr möglich, auf Schwarzrostresistenz im Feld zu bonitieren. Daher sollte eine Möglichkeit zur witterungsunabhängigen, effizienten Selektion für die Entwicklung resistenter Sorten gefunden werden.

#### Material und Methoden

Zur Entwicklung eines *in situ* Blattsegmenttests und zur Erzeugung einer spaltenden Kartierungspopulation wurde die diploide *L. perenne*-Familie LPSR2061 (BECKMANN et al. 2008) genutzt. In Anlehnung an Arbeiten zum Braunrost im Roggen (WEHLING et al. 2003) wurde ein Resistenztest entwickelt, bei dem Blattsegmente auf Benzimidazolagaroseplatten (WOLFE 1963) ausgelegt und pneumatisch inokuliert wurden. Während der Inkubation wurde besonders die Temperaturführung an die Bedürfnisse von *Lolium* Schwarzrostpilzen angepasst (RODERICK und THOMAS 1997). Als Inokulum dienten Gemische von Uredosporen, die aus Sporensammlungen unterschiedlicher Orte und Jahre (Malchow 2003, Bornhof 2007, Steinach 2007) an isoliert angezogenen Pflanzen vermehrt worden waren. Zudem wurde von jeder der drei Sporenherkünften je ein Einzelpustelisolat erzeugt und zur Inokulation verwendet. Die Bonitur der Blattsegmente erfolgte 9 bis 10 Tage nach der Inokulation nach einer Skala von 1 bis 9 (BECKMANN et al. 2008), die Grenze zwischen resistenten und anfälligen Pflanzen wurde zwischen den Boniturnoten 4 und 5 gezogen.

Als Kartierungspopulation wurde die in Blattsegmenttests mit je 50% anfälligen und resistenten aufspaltende BC<sub>1</sub>-Familie LPSR1001 mit insgesamt 404 Pflanzen ausgewählt,

<sup>1</sup> Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, Rudolf-Schick-Platz 3a, OT Groß Lüsewitz, D-18190 SANITZ

<sup>2</sup> Saatzeit Steinach GmbH, Wittelsbacher Straße 15, D-94377 STEINACH

<sup>3</sup> Agroscope Reckenholz-Tänikon (ART), Reckenholzstraße 191, CH-8046 ZÜRICH

<sup>4</sup> Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Am Gereuth 4, D-85354 FREISING

\* Ansprechpartner: Katrin BECKMANN, katrin.beckmann1@gmx.de

die aus der Kreuzung einer resistenten und einer anfälligen Pflanze der Familie LPSR2061 entstanden war. Für Nachkommenschaftstests von bonitierten Phänotypen wurden Pflanzen der Familie LPSR1001 bei 30°C unter Ausnutzung von Pseudokompatibilität geselbstet und ihre Nachkommen dem Blattsegmenttest unterzogen.

Um die Eignung des Blattsegmenttests zur Vorhersage des Befalls im Feld zu überprüfen, wurde die Familie LPSR1001 vernalisiert, im Frühjahr 2008 verklont und die Klonteile an drei Standorten mit allgemein hohem Schwarzrostbefall (Steinach, Freising, Zürich) als vollständig randomisierte Gitteranlage mit je 340 Prüfgliedern in zwei Wiederholungen ins Feld gepflanzt. Bonituren erfolgten nach dem 1 bis 9 EUCARPIA-Boniturschema für Rost bei Weidelgräsern (SCHUBIGER et al. 2007) im August 2008 und 2009.

Für Kopplungsanalysen wurden SSR (simple sequence repeat) und RGA (resistance gene analogs) Marker aus unterschiedlichen Quellen genutzt (KUBIK et al. 1999, JONES et al. 2002, IKEDA 2005, HIRATA et al. 2006). Kopplungsanalysen wurden mit JoinMap v.4 (VAN OOIJEN 2006) durchgeführt und mit Hilfe der Rekombinationsfrequenz verrechnet. Zur Umwandlung der ermittelten Rekombinationsraten in Centi-Morgan (cM) wurde die Kosambi-Kartierungsfunktion verwendet. Rangkorrelationen nach Spearman wurden mit PLABSTAT Version 3A (UTZ 2003) berechnet: die Ergebnisse der Signifikanztests werden durch Symbole angegeben: \*\* signifikant bei  $\alpha=0,01$ .

## Ergebnisse

Die Ergebnisse der Blattsegmenttests von 394 Individuen der Familie LPSR1001 zeigten mit 195:199 eine eindeutige 1:1 Aufspaltung zwischen resistenten und anfälligen Pflanzen, Individuen mit einer mittleren Krankheitsausprägung (Boniturnoten von 4-6) traten kaum auf (5/394). Für zehn Pflanzen der Familie LPSR1001 konnte kein Modalwert ermittelt werden, da sie schon nach der ersten Beprobung eingegangen waren. Blattsegmenttests zu unterschiedlichen Pflanzenentwicklungsstadien und mit drei verschiedenen Sporenherkünften wiesen mit 0,801\*\* bis 0,931\*\* hohe Korrelationen in der Boniturvergabe auf, daher wurde aus den Ergebnissen der Modalwert für jede Pflanze ermittelt. Ergebnisse von Inokulationen mit drei Einzelpustelisolaten zeigten mit 0,827\*\* bis 0,878\*\* hohe Korrelationen untereinander und zu den Modalwerten über die Sporenmischungen. Die Grenze zwischen anfälligen und resistenten Individuen, die zwischen Boniturnote 4 und 5 gezogen wurde, konnte durch Blattsegmenttests von Selbstungsnachkommen der Familie LPSR1001 verifiziert werden.

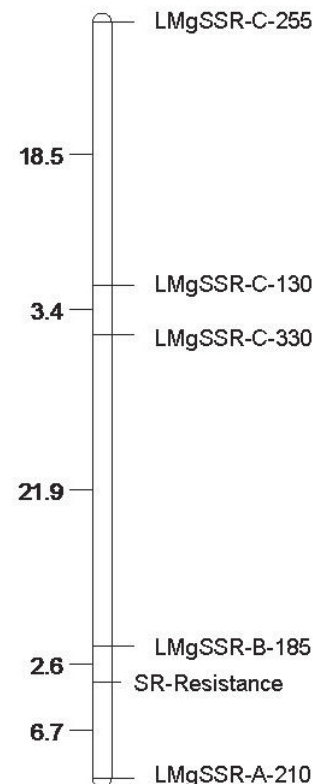
Auf Grund des strengen Winters 2008/2009 trat an den Standorten Zürich und Steinach im Sommer 2009 kaum Schwarzrost im Feldversuch auf, in Freising war der Versuch wegen erheblicher Niederschläge im Frühjahr und Sommer vollständig mit Blattkrankheiten befallen und ins Lager gegangen. Daher konnten die Feldversuche nur im Sommer 2008 bonitiert werden (Tabelle 1).

Die Kopplungsanalyse ergab mehrere mit der Resistenz gekoppelte SSR-Marker, unter anderem auch zwei flan-

**Tabelle 1: Ergebnisse der Feldversuche 2008 an drei Orten mit je zwei Wiederholungen und N=340 Phänotypen**

**Table 1: Results of field trials in 2008 at three locations with two replications and N=340 phenotypes (range of scores, mean, correlation coefficients between field trials and detached leaf test for each replication and their mean)**

Statistik / Ort	Freising	Zürich	Steinach
Variationsbreite Bonituren	1 - 9	1 - 8	1 - 9
Mittelwert	3,6	1,7	2,3
Korrelation Feld/Test			
1. Wiederholung	0,703**	0,422**	0,452**
2. Wiederholung	0,717**	0,385**	0,417**
Mittel 1./2. Wh.	0,750**	0,463**	0,513**



**Abbildung 1: Kartierung der Schwarzrostresistenz mit molekularen Markern (Marker wurden anonymisiert)**

**Figure 1: Mapping of the stem-rust resistance with molecular markers (markers are anonymous)**

kierende Marker im Abstand von 2,6 und 6,7 cM zum Resistenzgen (Abbildung 1).

## Diskussion

Hohe Korrelationen zwischen den Ergebnissen unabhängiger Blattsegmenttests auch zu unterschiedlichen Pflanzenentwicklungsstadien weisen auf eine gute Wiederholbarkeit des Tests und auf das Vorhandensein einer stadienunspezifischen Resistenz hin, wie sie z. B. auch beim Braunrost im Roggen beobachtet wurde (ROUX et al. 2004). Die beobachtete 1:1-Aufspaltung der Familie LPSR1001 in resistente und anfällige Individuen, die durch Nachkommenschaftstests abgesichert werden konnte, spricht für eine monogene und dominante Vererbung der Resistenz.

Die Wirksamkeit der gefundenen Resistenz gegen die drei verwendeten Inokula lässt auf eine rassenunspezifische Resistenz hoffen, wie sie z.B. gegen Schwarzrost auch im Weizen und in der Gerste gefunden wurde (MCINTOSH et al. 1995, AYLIFFE und LAGUDAH 2004), und könnte auf eine gute Beständigkeit der Resistenz hindeuten.

Die Ergebnisse der Feldversuche zeigen deutlich die Witterungsabhängigkeit des Schwarzrostbefalls im Feld. So kann es vorkommen, dass infolge fehlenden Infektionsdrucks während des gesamten Züchtungsprozesses einer Sorte nicht auf Schwarzrostresistenz selektiert werden kann. Erschwerend für eine Züchtung auf Schwarzrostresistenz kommt hinzu, dass im Feldversuch in der Regel verschiedene Blattkrankheiten gleichzeitig auftreten und speziell die Rostkrankheiten schwer zu unterscheiden sind. An den Standorten Steinach und Zürich trat auch im Jahr 2008 kaum Schwarzrost im Feldversuch auf; die signifikanten Korrelationen zwischen den beiden Wiederholungen vom Feld und den Beobachtungen aus dem Blattsegmenttest sind hier nur auf die hohe Anzahl an Prüfgliedern zurückzuführen. Höherer Infektionsdruck herrschte am Versuchsstandort Freising; hier zeigen die Ergebnisse mit Korrelationen von 0,703\*\* für die erste Wiederholung und 0,717\*\* für die zweite Wiederholung, sowie 0,750\*\* für die Mittelwerte über die zwei Wiederholungen gute Übereinstimmungen der Feldbonituren der einzelnen Pflanzen zu ihren Modalwerten im Blattsegmenttest. Somit gelang es erstmals, einen Blattsegmenttest für Schwarzrost bei Weidelgräsern zu entwickeln, der eine Bonitur unabhängig von Jahreszeit und Witterungsbedingungen ermöglicht. Im Vergleich zu den in den USA angewandten künstlichen Infektionsmethoden für Schwarzrost in Gräsern, die allesamt auf der Inokulation von Pflanzen im Gewächshaus oder in Klimakammern beruhen (ROSE-FRICKER et al. 1986, WELTY und BARKER 1992), ist der entwickelte Blattsegmenttest extrem Platz sparend und energieeffizient, da lediglich ein Klimaschrank und keine Gewächshausfläche oder Klimakammer benötigt wird. Weitere Vorteile des Blattsegmenttests liegen in der Möglichkeit seines Einsatzes zu einem frühen Pflanzenentwicklungsstadium und der Schonung der Spenderpflanzen, die eine zeitgleiche und unabhängige Untersuchung der gleichen Pflanze auf unterschiedliche Erreger oder Isolate ermöglicht.

Molekulare Analysen konnten zwei flankierende Marker (LMgSSR-A-210 und LMgSSR-B-185) für das gefundene Resistenzgen detektieren, die gemeinsam zur Selektion verwendet werden können. Aus den für die beiden Marker ermittelten Rekombinationsfrequenzen zum Resistenzgen von  $r_1=0,0253$  bzw.  $r_2=0,0633$  ergibt sich nach WEBER und WRICKE (1994) eine gemeinsame Rekombinationsfrequenz von  $r_{ges}=0,0017$  zum Resistenzgen. Diese Marker bieten zusammen somit eine gute Möglichkeit zur indirekten Selektion resistenter Individuen. Der entwickelte Blattsegmenttest ist zwar einfach in der Anwendung und unerlässlich zum ersten Auffinden einzelner Resistenzgene; der limitierende Faktor besteht aber in der Verfügbarkeit des Inokulums. Bei geringem Schwarzrostbefall im Feld ist natürliches Inokulum kaum vorhanden, die Uredosporen müssen dann in einem zeitaufwändigen Verfahren unter kontrollierten Bedingungen an anfälligen Pflanzen

vermehrt werden. Die Möglichkeit einer markergestützten Selektion zur Einkreuzung der gefundenen Resistenzen in Zuchtmaterial erscheint somit züchtungsmethodisch interessant.

## Danksagung

Dank gilt Ruth Masermann, Marion Hos und Daniela Kempke für die Unterstützung bei den technischen Arbeiten. Das Projekt wurde finanziell gefördert durch die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen Otto von Guericke e.V. (AiF) und in Kooperation mit der Saatzucht Steinach GmbH durchgeführt.

## Literatur

- AYLIFFE MA, LAGUDAH ES, 2004: Molecular genetics of disease resistance in cereals. *Ann Bot* 94, 765-773.
- BECKMANN K, LELLBACH H, WEHLING P, 2008: Genetische Analyse und molekulare Charakterisierung von Schwarzrostresistenz in Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne* L.). Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut, 1. Nachwuchswissenschaftler-Forum in Quedlinburg, 12-16.
- HIRATA M, CAI H, INOUE M, YUYAMA N, MIURA Y, KOMATSU T, TAKAMIZO T, FUJIMORI M, 2006: Development of simple sequence repeat (SSR) markers and construction of an SSR-based linkage map in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Theor Appl Genet* 113, 270-279.
- IKEDA S, 2005: Isolation of disease resistance gene analogs from Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Grassland Sci* 51, 63-70.
- JONES ES, DUPAL MP, DUMSDAY JL, HUGHES LJ, FORSTER JW, 2002: An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor Appl Genet* 105, 577-584.
- KUBIK C, MEYER WA, GAUT BS, 1999: Assessing the abundance and polymorphism of simple sequence repeats in perennial ryegrass. *Crop Sci* 39, 1136-1141.
- MCINTOSH RA, WELLINGS CR, PARK RF, 1995: Wheat rusts: an atlas of resistance genes. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- RODERICK HW, THOMAS BJ, 1997: Infection of ryegrass by three rust fungi (*Puccinia coronata*, *P. graminis* and *P. loliina*) and some effects of temperature on the establishment of the disease and sporulation. *Plant Pathol* 46, 751-761
- ROSE-FRICKER CA, MEYER WA, KRONSTAD WE, 1986: Inheritance of resistance to stem rust (*Puccinia graminis* subsp. *graminicola*) in six perennial ryegrass (*Lolium perenne*) crosses. *Plant Dis* 70, 678-681.
- ROUX SR, HACKAUF B, LINZ A, RUGE B, KLOCKE B, WEHLING P, 2004: Leaf-rust resistance in rye (*Secale cereale* L.). 2. Genetic analysis and mapping of resistance genes *Pr3*, *Pr4*, and *Pr5*. *Theor Appl Genet* 110, 192-201.
- SCHUBIGER FX, STRECKEISEN P, BOLLER B, 2007: The EUCARPIA multisite rust evaluation - Results of the trials 2004. In: Rosellini D, Veronesi F (eds), Breeding and seed production for conventional and organic agriculture, Proc 26<sup>th</sup> Meeting EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section, 3-7 Sep 2006, Perugia, Italy, 154-158. Università degli Studi di Perugia.
- UTZ HF, 2003: PLABSTAT, ein Computerprogramm zur statistischen Analyse von pflanzenzüchterischen Experimenten. Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik, Universität Hohenheim, Stuttgart.
- VAN OOIJEN JW, 2006: JoinMap version 4.0, software for calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen.

- WEBER WE, WRICKE G, 1994: Genetic markers in plant breeding. Fortschritte der Pflanzenzüchtung, Beiheft Z Pflanzenzüchtg 16, 57-58.
- WEHLING P, LINZ A, HACKAUF B, ROUX SR, RUGE B, KLOCKE B, 2003: Leaf-rust resistance in rye (*Secale cereale* L.). 1. Genetic analysis and mapping of resistance genes *Pr1* and *Pr2*. Theor Appl Genet 107, 432-438.
- WELTY RE, BARKER RE, 1992: Evaluation of resistance to stem rust in perennial ryegrass grown in controlled and field conditions. Plant Dis 76, 637-641.
- WOLFE MS, 1963: Use of benzimidazole in the study of wheat powdery mildew. Trans Br Mycol Soc 46, 620.



# Vereinfachung der markergestützten Selektion in der Pflanzenzüchtung durch die Datenbanken des Unternehmens IT-Breeding GmbH

## Implementation of the marker-assisted selection in the plant breeding programmes with the databases of IT-Breeding GmbH.

Lyudmyla V. Malysheva-Otto<sup>1\*</sup>, Fabian Gerstenberg und Lars-Gernot Otto

### Abstract

IT-Breeding GmbH, a start-up company from the Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research in Gatersleben, Germany, is a specialized service company which is active in the field of Research and Development with the focus on plant breeding. The company offers a combination of Product-Service. IT-Breeding develops an integrated resource of molecular and genetic information at the basis of plant traits. The resource is generated by (1) extensive and simultaneously highly specific acquisition of the relevant data from the Web, (2) analysis of the data based on company's internal know-how, (3) display of the evaluated data via uncomplicated user-friendly interface. The evaluated information IT-Breeding provides to the customers as Customer Databases for various plant species. The accompanying consulting service supports the breeders by the choice of molecular markers for specified traits, if necessary - by the choice of service company for genotyping, and by statistical evaluation and interpretation of the data after the molecular analysis. Implementation of the provided information, either in the form of the database or consulting, allows the breeders to create the programmes for the development of new varieties which will be significantly more time- and cost-effective. As a result the breeding company will gain the competitive advantage over competitors on the market.

### Keywords

Consulting services, databases, MAS, marker assisted selection, molecular data, plant traits, statistical data analysis

### Einleitung

Die Pflanzenzüchtung stellt eine der ältesten Wissenschaften der Menschheitsgeschichte dar. Jede Form der Pflanzenzüchtung, sowohl die klassische kreuzungsbasierte Züchtung als auch die Züchtung durch Einbeziehung verschiedener biotechnologischer Methoden, zielt auf die Veränderung des genetischen Materials der Pflanze, um neues und/oder verbessertes Pflanzenmaterial zu erzeugen.

Seit langer Zeit benutzen Züchter phänotypische Eigenschaften, um die besten Pflanzen unter den Nachkommen aus der Kreuzung von Eltern, die beide verschiedene wertvolle Eigenschaften besitzen, auszuwählen. Heutzutage sind die Züchter jedoch mit den drängenden globalen Herausforderungen konfrontiert, wie der rasant wachsenden Bevölkerung der Erde, begrenzten Boden- und Wasserressourcen und der Bedrohung durch den weltweiten Klimawandel. Von den Züchtern wird erwartet, dass Kulturpflanzen, die den neuen Anforderungen entsprechen und gleichzeitig eine hohe Ertragsleistung zeigen, in einem verkürzten Zeitrahmen entwickelt werden. Die einzige Möglichkeit dieser Herausforderung zu begegnen, ist die Integration der wissenschaftlichen Erkenntnisse über den genetischen Hintergrund der Merkmale, die in den letzten Jahren akkumuliert wurden.

### Datenmenge in der molekularen Pflanzenwissenschaft

In den letzten Jahrzehnten haben die Wissenschaftler große Datenmengen über pflanzliche Genome zusammengetragen, die die verschiedenen Aspekte des Pflanzenwachstums und der Pflanzenentwicklung betreffen. Diese Informationen werden in wissenschaftlichen Publikationen beschrieben und sind größtenteils über das Internet frei zugänglich zu erhalten. Wie das Beispiel der Literaturdatenbank PubMed zeigt (*Abbildung 1*), erhöhte sich die Menge an verfügbarer Information insbesondere in den letzten Jahren sehr stark.

Allerdings besteht das Problem darin, dass die vorhandenen Informationen zwar verfügbar sind, aber auf eine Vielzahl von Datenbanken verteilt sind (unterschiedliche Literaturdatenbanken und Webquellen wie z.B. GrainGenes, Gramene, MASWheat, etc.) und nicht systematisch erfasst werden. Hierbei werden die Daten auch nach unterschiedlichen Kriterien geordnet. Jeder Autor einer wissenschaftlichen Veröffentlichung präsentiert z. B. die Daten jeweils entsprechend seiner eigenen Herangehens- und Betrachtungsweise. Zurzeit gibt es Webquellen, die die molekularen Daten für bestimmte Pflanzenarten mit dem Ziel präsentieren, die wissenschaftliche Gemeinschaft über die verfügbaren Daten zu informieren (z.B. GrainGenes, Gramene, Komugi). Andererseits gibt es Webquellen,

<sup>1</sup> IT-Breeding GmbH, Am Schwabeplan 1b, D-06466 GATERSLEBEN

\* Ansprechpartner: Dr. Lyudmyla V. MALYSHEVA-OTTO, malysheva-otto@it-breeding.de

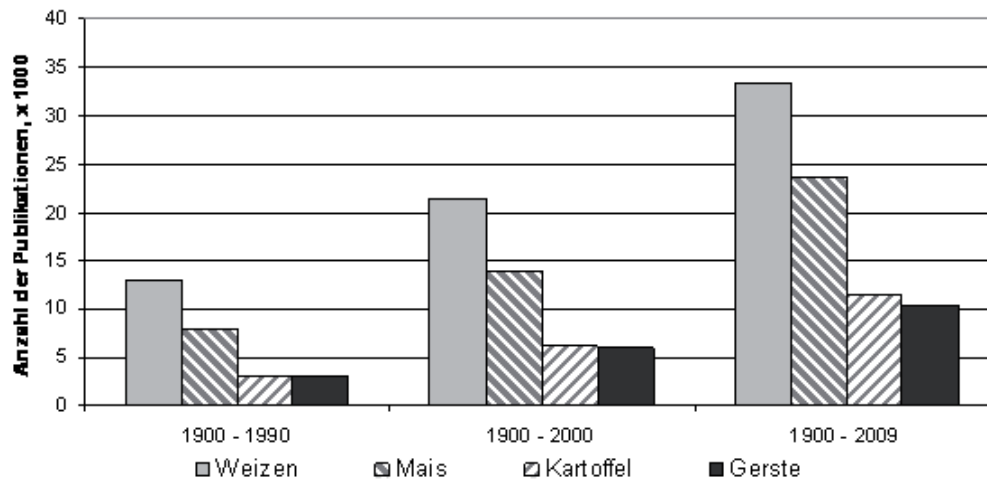


Abbildung 1: Anzahl der wissenschaftlichen Publikationen je nach Kulturart und Zeitraum

Figure 1: Number of publications ( $\times 1000$ ) on wheat, maize, potato and barley in the respective time periods

die von Interesse für Pflanzenzüchter und Saatguthändler sind, aber die molekularen Daten nicht betrachten (z.B. SeedQuest). Internationale Expertenanalysen gehen davon aus, dass die Nutzung biotechnologischer Verfahren künftig weiter voranschreiten wird und die Basis für so genannte Bioökonomie legt (BUNDESMINISTERIUM FÜR BILDUNG UND FORSCHUNG 2009).

IT-Breeding entwickelt eine Plattform für die Darstellung von molekularen und genetischen Daten, die speziell auf die Bedürfnisse des einzelnen Züchters abgestimmt sowie analysiert werden und über eine anwenderfreundliche Oberfläche verfügbar sind. Die Plattform dient als Basis, die es jedem erlaubt, auf die nötigen Informationen schnell und einfach zuzugreifen.

## Entwicklung und Struktur der Datenbanken

Um den Zugriff auf das vorhandene Wissen zu unterstützen, werden die Daten über die molekularen Hintergründe der Pflanzenmerkmale aus den verschiedenen Webquellen

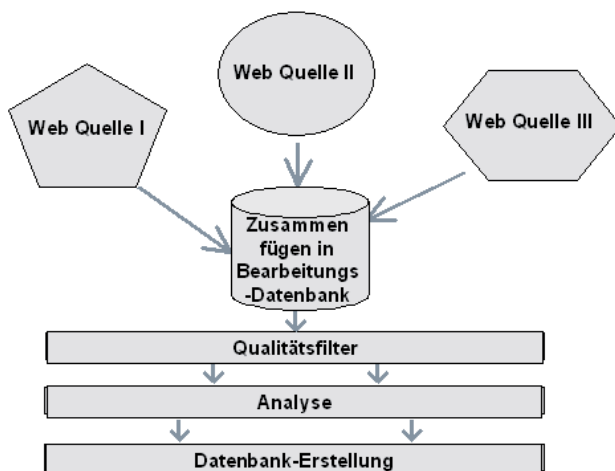


Abbildung 2: Ein Abriss der Entwicklung der Datenbank des Unternehmens

Figure 2: An outline of the development of the stock database of the company

integriert sowie ständig aktualisiert und ausgewertet. Die von IT-Breeding entwickelte Plattform präsentiert bei den molekularen Hintergründen der Pflanzenmerkmale Informationen über die Gene, QTLs und molekulare Marker, welche mit den diversen Pflanzenmerkmalen verbunden sind. Das Schema für die Entwicklung der Stammdatenbank, die die Grundlage für die spezifischen Leistungen des Unternehmens bildet, ist in *Abbildung 2* veranschaulicht.

Die ausgewerteten Informationen werden Kunden in Form von kundenspezifisch erstellten Datenbanken (KSDBen) für bestimmte Kulturpflanzenarten (z.B. Weizen, Gerste, Raps) angeboten. Die Oberfläche der KSDBen hat eine sehr klare Struktur mit Fenstern für die Auswahl der Pflanzenmerkmale auf der einen Bildschirmseite und deren genetischen Parametern (Marker, Gene und QTLs) auf der anderen Seite. Dies ermöglicht eine schnelle und unkomplizierte Suche nach den gewünschten Informationen.

## Anwendung des Fachwissens bei der Entwicklung neuer Sorten

Das erworbene Wissen über den genetischen Hintergrund von Pflanzenmerkmalen dient als eine effiziente Basis für moderne Pflanzenzüchtung. Es wird von Wissenschaftlern fortdauernd weiterentwickelt und vergrößert. Auf dieser Basis können neue Sorten schneller und zielgerichteter entwickelt werden. Das Wissen kann hierbei während zweier Schritte bei der Entwicklung neuer Sorten angewandt werden: (1) Auswahl der Eltern für das Kreuzungsprogramm (siehe z.B. GUR and ZAMIR 2004), (2) Evaluierung und Auswahl der Nachkommen (siehe z.B. KUCHEL et al. 2005, BRENNAN and MARTIN 2007).

Falls die Assoziation zwischen einem molekularen Marker und einem bestimmten Merkmal bekannt ist, kann der Marker benutzt werden, um die besten Elternpflanzen für die Kreuzung zu finden. Das Germplasma wird mit Hilfe des Markers durchsucht, um die Sorte oder Akzession zu finden, die das erforderliche Markerallel aufweist, was als Beleg für die Existenz des gewünschten Merkmals angesehen wird. Während der Evaluierung der Kreuzungsnachkommen

können Protokolle für die markergestützte Selektion (entwickelt auf der Grundlage der QTL-Detektion oder Marker-Merkmal Assoziation) angewandt werden, um den Züchtungsprozess zu beschleunigen.

### Der Umfang der kundenspezifisch erstellten Datenbanken und der Beratung

Die Kundendatenbank von IT-Breeding gibt den Züchtern die Informationen über die Gene, von denen bekannt ist, dass diese mit spezifischen Merkmalen verbunden sind (inkl. Referenzen zu den Sorten, die in die Untersuchungen einbezogen wurden) und ob die Marker innerhalb oder in Assoziation mit diesen Genen entwickelt wurden. Bei den Informationen über die molekularen Marker werden die Marker genannt, die mit spezifischen Merkmalen verbunden sind (QTLs) und es wird aufgeführt, ob die Marker erfolgreich für die markergestützte Selektion genutzt wurden (mit Referenz zu den untersuchenden Populationen). Die Datenbanken werden individuell für jeden Kunden erstellt. Sie enthalten umfangreiche Informationen oder können in Form von Modulen erstellt werden (siehe *Abbildung 3*), um spezielle Fragestellungen leichter zu beantworten.

Die Kundendatenbanken versetzen den Züchter in die Lage, schnell und ohne zusätzlichen Zeitaufwand die weltweit veröffentlichten Daten über die Gene und über die Marker für die Pflanzenmerkmale, welche ihn interessieren, zielgerichtet und zeitnah zu durchsuchen. Daraus ergibt sich eine bestmögliche Informations- und Entscheidungsgrundlage, um ein Züchtungsprogramm für die oder das gewünschte(n) Merkmal(e) zu erstellen.

Das flankierende Beratungsangebot der IT-Breeding GmbH unterstützt die Züchter bei der Auswahl der Marker, bei Bedarf auch bei der Suche nach dem kosteneffektivsten Dienstleister für die Genotypisierung, und bei der statistischen Auswertung und Interpretation der Daten nach der molekularen Analyse (mit Hilfe der Programme Diversity, PopGene, Arlequin, NTSYS, TASSEL).

### Vorteile für Züchter

Die Dienstleistungen der IT-Breeding GmbH helfen bei dem Transfer des angesammelten Wissens der molekularen Pflanzenwissenschaften in die Praxis. Die Kundendatenbanken von IT-Breeding kombinieren die Vorteile von Suchmaschinen mit der Informationsanalyse. Die Datenbanken stellen

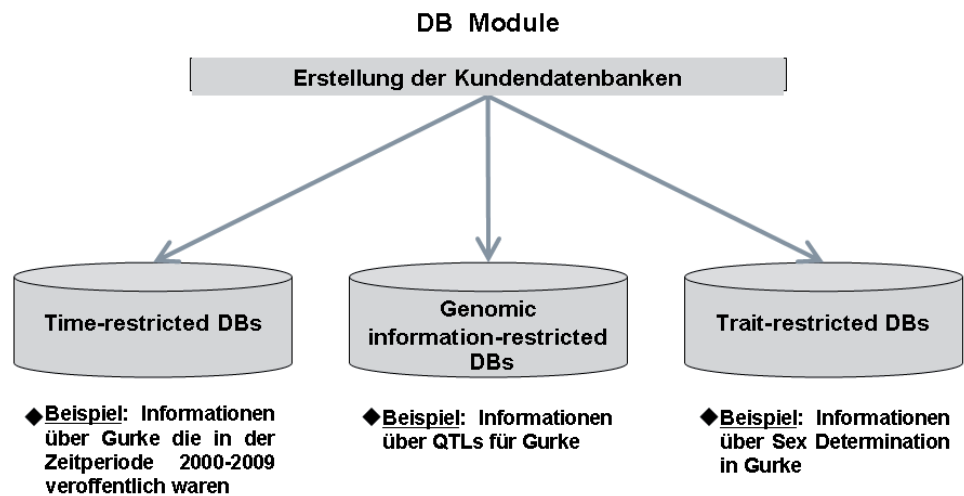


Abbildung 3: Ein Überblick über die eventuellen kundenspezifischen Datenbank-Module  
Figure 3: An overview of the possible customer-specific database modules

eine kundenspezifische Informationsplattform dar, deren sorgfältig überprüfte und analysierte Daten aus renommierten Quellen stammen und kontinuierlich gepflegt wie auch aktualisiert werden. Sie stellen eine Informationsanalyse durch die Extraktion der für das Züchtungsprogramm wichtigsten Daten bereit. Die Beratungsdienstleistung garantiert individuelle Kundenbetreuung, insbesondere in Hinblick auf spezielle Kundenwünsche und -bedürfnisse.

Durch die Auswahl der Dienstleistungen von IT-Breeding erhält der Kunde folgende Vorteile: (i) eine zuverlässige Quelle an integrierten Informationen über die genetischen Hintergründe der gewünschten Pflanzenmerkmale, kein Verlust wichtiger Informationen, (ii) konstante Integration der neuesten Publikationen, immer aufgearbeitet in der gleichen, anwenderorientierten Form, (iii) deutliche Zeit- und Geldersparnis gegenüber einer selbst durchgeführten Erfassung und Analyse von ähnlichen Informationen seitens des Züchters, (iv) die Informationen bzgl. der molekularen Marker erleichtern die Integration der markergestützten Selektion in die Pflanzenzüchtungsprogramme, (v) bei der Beratung Zugriff auf unsere Kompetenzen, welche 100% mit den Fragestellungen der Pflanzenzüchter verbunden sind.

### Literatur

- BRENNAN JP, MARTIN EP, 2007: Returns to investment in new breeding technologies. *Euphytica* 157, 337-349.
- GUR A, ZAMIR D, 2004: Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biology* 2, e245. DOI:10.1371/journal.pbio.0020245
- KUCHEL H, YE G, FOX R, JEFFERIES S, 2005: Genetic and economic analysis of a targeted marker-assisted wheat breeding strategy. *Mol Breed* 16, 67-78.
- BUNDESMINISTERIUM FÜR BILDUNG UND FORSCHUNG, 2009: Runder Tisch zur Pflanzengenetik [Available online: <http://www.bmbf.de/de/13622.php>; accessed 20 Jan 2010].

# Sommergerstenselektion unter Flugbrandbefall mit Infektions- und Trennstreifen statt Marker

## Spring barley selection under loose smut attack with seed stripes for infection and separation instead of marker

Karl-Josef Müller<sup>1\*</sup>

### Abstract

Spreading of loose smut (*Ustilago nuda* (Jens.) Rostr.) was observed during three vegetation periods in a breeding area under organic farming with segregating generations of spring barley up to  $F_9$  including lines with resistant parents and extended with susceptible varieties and genetic resources. Seed stripes with loose smut infection were implemented for a better spreading of the disease in some parts, which could be verified. Plots with non-infected seeds of a susceptible variety were implemented in between the segregating lines to detect degrees of spreading. Selected lines without infection were inoculated with a loose smut suspension into the flowers of single ears starting in  $F_5$ . From  $F_5$  to  $F_7$  most of the susceptible lines were identified by natural infection. One generation under natural infection was not enough to get a sustainable result about susceptibility, but only one out of ten inoculated ears gave additional information. For this reason it was suggested only to use seed stripes for disease spreading during three generations from  $F_4$  to  $F_6$  and artificial inoculation only for a check of resistance in  $F_7$  and for new accessions to test. With this method different origins of resistance can be handled parallel and it is a possibility to develop quantitative resistance on a low budget scheme additionally.

### Keywords

*Hordeum vulgare*, natural infection, organic breeding resistance, *Ustilago nuda*

### Einleitung

Derzeit sind keine für den ökologischen Landbau praktikable Saatgutbehandlungsmethoden zur Reduzierung eines Flugbrandbefalls (*Ustilago nuda* (Jens.) Rostr.) von Sommergerste (*Hordeum vulgare* L.) unter die für eine Z-Saatguterzeugung geforderte Schwelle in Sicht. Resistenzzüchtung ist das einzige Mittel der Wahl. Nach fast einem Jahrhundert der Züchtung mit Saatgutbeizung fehlt aber die Erfahrung, wie der Einstieg in eine Flugbrandresistenzzüchtung unter natürlichen Befallsbedingungen mit überschaubarem Aufwand erfolgen kann. Ebenso unklar war bisher, inwieweit auf arbeitsaufwendige künstliche Inokulationen in die Blüte zur Prüfung einer Flugbrand-

anfälligkeit verzichtet werden kann. Daher wurde der Zuchtgarten der Getreidezüchtungsforschung Darzau, der über eine zunehmende Anzahl von Zuchtstämmen verfügt, in die Flugbrandresistente Eltern eingekreuzt worden waren, und die Datenerhebung im Zuchtgarten über die Jahre 2007 bis 2009 in der Weise modifiziert, dass Aussagen über die Flugbrandsporenverbreitung und den Selektionserfolg gemacht werden konnten.

### Material und Methoden

In den Sommergerstenzuchtgarten mit Nachkommen-schaften, Sorten und genetischen Ressourcen wurde in der Vegetation 2007 über den Zuchtgarten verteilt auf 37 Zuchtgartenparzellen anstelle von Zuchtstämmen Saatgut der flugbrandanfälligen Sorte Lawina ausgesät, das aber noch nicht mit Flugbrand befallen war. In der Vegetation 2008 wurde die Anzahl dieser Sporenfängerparzellen auf 60 erhöht. Diese Parzellen dienten dem Einfangen von Flugbrandsporen und zur Beurteilung der Sporenkonzentration an dieser Position des Zuchtgartens anhand des Befallsgrades im Folgejahr. Zum Vergleich wurde der ermittelte Befallsgrad im Rasterplan an der entsprechenden Position in % und fett umrahmt wiedergegeben, obwohl der Wert erst im Folgejahr ermittelt wurde. Damit konnte ein visueller Bezug zwischen der Flugbrandähre dichte der umliegenden Parzellen und der Sporenkonzentration an der Position der Sporenfängerparzellen hergestellt werden.

Für eine gleichmäßige Verbreitung von Sporen wurde in jeder dritten Fahrspur anstelle von Zuchtgartenparzellen ein Saatstreifen mit Flugbrand befallenem Saatgut eingefügt (in den Rasterplänen als von links nach rechts durchgehende, schwarze Streifen dargestellt). In der Vegetation 2007 wurden acht solcher Infektionsstreifen bis in die  $F_5$  hinein angelegt. In der Vegetation 2008 wurden die Anzahl der Infektionsstreifen bis zum Ende der  $F_5$  auf zehn erhöht und zusätzlich zwei Infektionsstreifen im Bereich neu hinzugekommener Sorten, Zuchtstämme anderer Züchter und genetischer Ressourcen zur Anhebung der natürlichen Sporenkonzentration in diesem Teilbereich eingefügt. In den Generationen ab  $F_6$  wurden anstelle von Infektionsstreifen, Trennstreifen mit einer Gerste ohne Befall eingefügt (in den Rasterplänen von links nach rechts durchgehende, weiße Streifen). In den Jahren 2007 und 2008 betrug die

<sup>1</sup> Getreidezüchtungsforschung Darzau, Hof 1, D-29490 NEU DARZAU

\* Ansprechpartner: Dr. Karl-Josef MÜLLER, [www.darzau.de](http://www.darzau.de)

durchschnittliche Anzahl befallener Ähren 23 bzw. 15 pro Zuchtgartenparzellenäquivalent.

Die Bruttogrundfläche pro Zuchtgartenkleinparzelle betrug 2,25 m<sup>2</sup> inklusive Zwischenräume zu den Nachbarparzellen. Jede Zuchtgartenparzelle bestand aus sechs Drillreihen von je 1 m Länge mit je einer Ährenachkommenschaft bei 20 cm Drillreihenabstand. Eine Zuchtgartenparzelle entspricht einem Kästchen in den Rasterplänen. In den Jahren 2007 und 2008 wurden 1760 bzw. 1920 Zuchtgartenparzellen

zwischen Saatstreifen mit bzw. ohne Befall angebaut. Über alle Rasterelemente hinweg einschließlich der einer Zuchtgartenparzelle entsprechenden Flächenäquivalente in den Infektionsstreifen wurde der Befall mittels Auszählung der befallenen Ähren erfasst.

In den Rasterplänen wurden die Zuchtgartenparzellen ohne Befall weiß dargestellt. Mit zunehmender Anzahl befallener Ähren von 1 bis 9 je Zuchtgartenparzelle wurden stattdessen zunehmend dunkler grau hinterlegte Kästchen eingefügt.

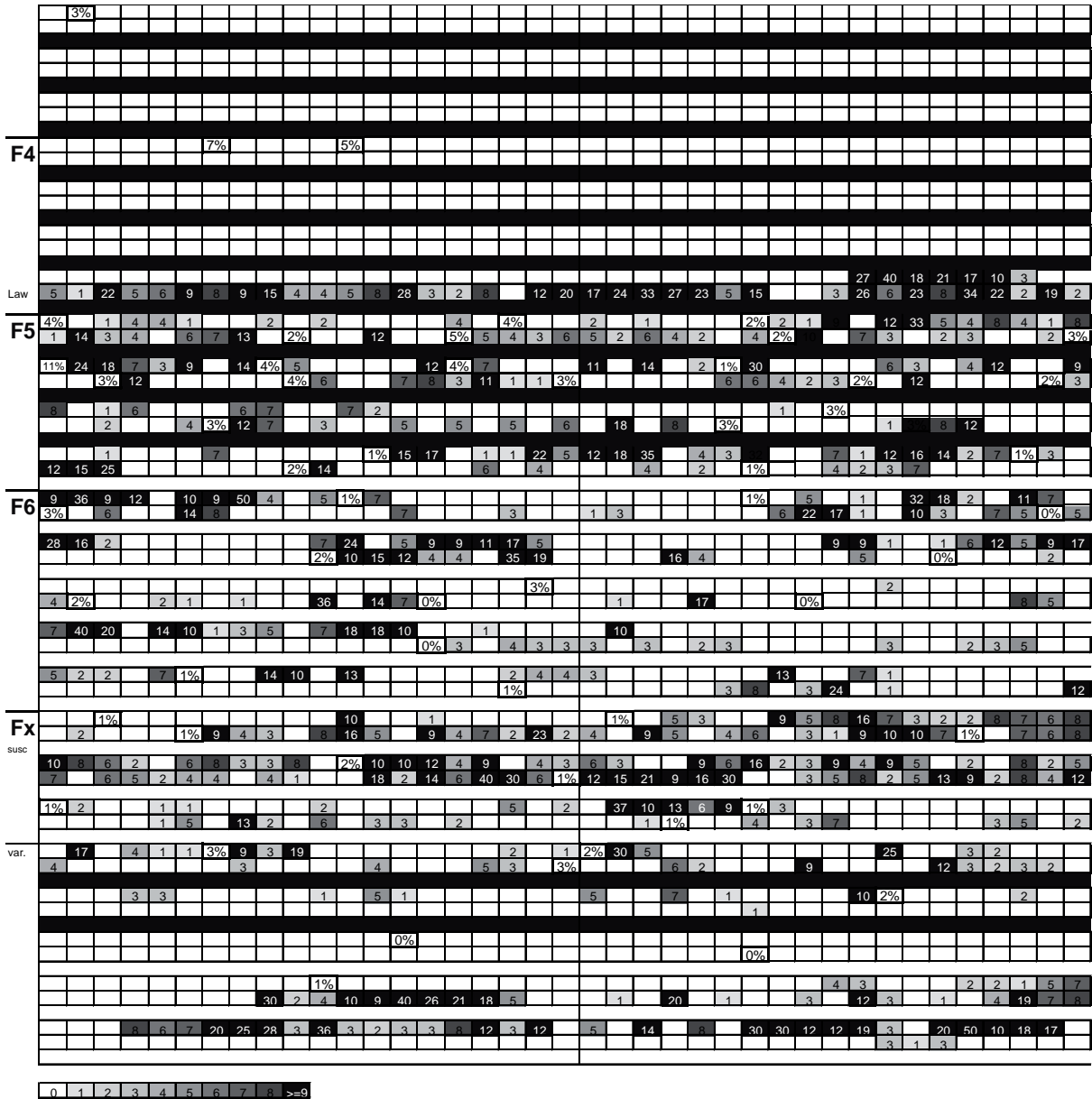


Abbildung 1: Rasterplan für den Zuchtgarten in der Vegetation 2007

Figure 1: Map of nursery plots in 2007. Every square in the map represents a small plot with close related descendants. There are 40 in a row. Ears with loose smut are written as numbers inside. Plots without infected ears are printed in white and those with more than eight in black. Throughout going stripes from left to right represent infection stripes with loose smut in black and seperating stripes without smut in white. Squares with data in % are plots with loose smut susceptible variety Lawina and the data show the degree of loose smut infection measured in the following year as an information about spreading of spores. The main direction of wind from west is on the right side. Segregating generations rise from top down and varieties as well as genetic resources are implemented at the bottom.

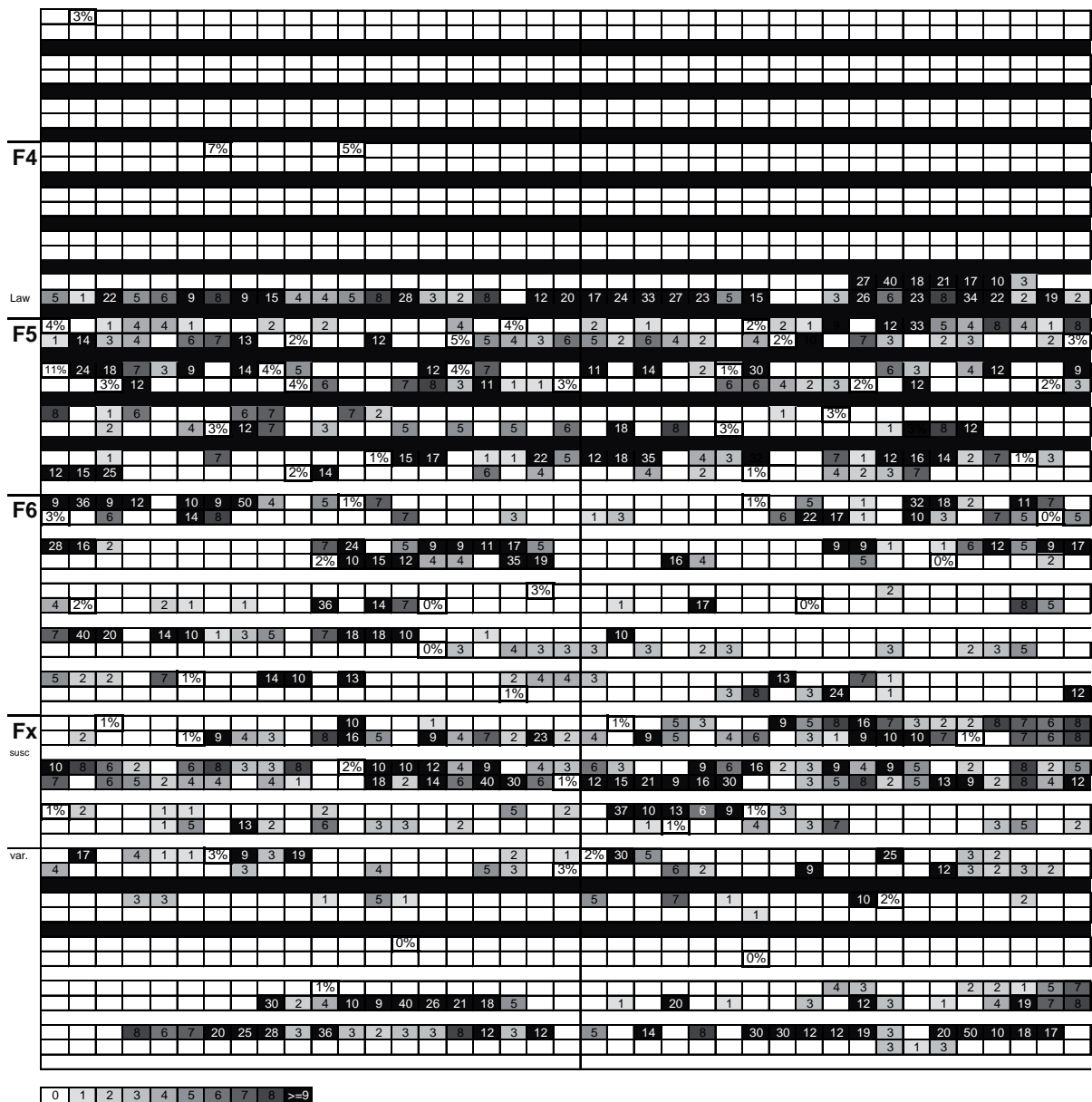


Abbildung 2: Rasterplan für den Zuchtgarten in der Vegetation 2008

Figure 2: Map of nursery plots in 2008. Explanation see Figure 1. Infection stripes additionally implemented at the bottom in the area with new varieties.

Sofern neun und mehr Flugbrandähren festgestellt wurden, erfolgte die Darstellung der Zuchtgartenparzelle in schwarz.

Die natürliche Infektion konnte erst mit der Generation F<sub>4</sub> beginnen, die aus der noch ohne Flugbrandbefall in Neuseeland zwischenvermehrten F<sub>3</sub> stammt. Ab der Generation F<sub>5</sub> bis F<sub>8</sub> wurden in vorselektierten Zuchtgartenparzellen ohne Befall und an einigen neu zu prüfenden Sorten immer zwei Ähren zusätzlich künstlich mit einer Sporensuspension in einer Konzentration von 1 g Flugbrandsporen pro 1 Liter Wasser direkt in die einzelnen Blüten inokuliert (MÜLLER 2005). Das Saatgut der künstlich inokulierten Ährennachkommenschaften wurde im Folgejahr einzeln ausgewiesen neben den nicht inokulierten Ährennachkommenschaften der gleichen Nachkommenschaftsgruppe ausgesät. Dadurch

erhöhte sich der Befallsdruck insbesondere im Bereich der Parzellen mit neuen, mehr oder weniger anfälligen Sorten. Die aus der künstlichen Inokulation hervorgegangenen Pflanzen dienten immer nur der Befallskontrolle. Es wurde nie aus diesen direkt nachgebaut, sondern nur aus den unmittelbaren Geschwistern selektiert.

Die Feldversuche wurden am Standort Köhlingen bei Neu Darchau in Nord-Ost-Niedersachsen durchgeführt. Vorfrucht war in allen Jahren Kartoffel. Die Aussaat erfolgte 2007 am 30. März auf einem lehmigen Sandboden mit 49 Bodenpunkten. Im Jahr 2008 konnte der Zuchtgarten in unmittelbarer Nachbarschaft zum Vorjahresstandort erst am 21. April gesät werden. Alle Flächen hatten A-Status nach EU-Bio-Verordnung. Das Ertragsniveau in den jeweils unmittelbar benachbarten Sommergersten-

Leistungsprüfungen lag für die Vergleichssorte Barke in 2007 bei 26 dt/ha und in 2008 bei 31 dt/ha. Im langjährigen Mittel lagen die Jahres-durchschnittstemperatur an diesem Standort bei 9°C und der Jahresniederschlag bei 630 mm. Die Vegetation im Jahr 2007 war von einem extrem trockenen und warmen April und überdurchschnittlich feuchten Frühsommer geprägt, wobei sich die Sommergerste eher etwas zu üppig in die Länge entwickelte. Im Jahr 2008 war der April feucht und kühl, dafür aber der Mai bis in die erste Junihälfte hinein sehr trocken und warm. Dies behinderte das Streckungswachstum der Sommergerste und begünstigte eine frühe Blüte bereits in der Blattscheide. Im Jahr 2009 war insbesondere der April, aber auch der Mai sehr trocken und warm.

## Ergebnisse

Bei der Rückführung des Befalls auf die Rasterpläne des Vorjahres zeigten sich für die mit der Sporenfängersorte Lawina bestückten Parzellen (fett gerahmt) unterschiedliche Befallsgrade (%) in Abhängigkeit von der Position im Zuchtgarten. Die zwischen den Zuchtgartenparzellen direkt neben den Infektionsstreifen angebauten Sporenfängerparzellen zeigten im Nachbau einen Befall von 5-33% aus dem Anbau 2007 und 1-11% aus dem Anbau 2008. Demgegenüber zeigten die übrigen Sporenfängerparzellen mit mehr oder weniger größerem Abstand zu den Infektionsstreifen einen Befall von 0-24% aus dem Anbau 2007 und 0-3% aus dem Anbau 2008. Wie auf den Rasterplänen ersichtlich ist der Bereich ohne Infektionsstreifen aufgrund der sich als anfällig herausstellenden Zuchtstämme nicht frei von Flugbrandähren und begünstigt damit auch eine Infektion der Sporenfängerparzellen in diesem Bereich.

In Abhängigkeit von der Nähe zu den Infektionsstreifen konnten beim Mittelwertvergleich signifikante Unterschiede hinsichtlich des Befallsgrades festgestellt werden (*Tabelle 1*). Sporenfängerparzellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Infektionsstreifen wurden im Durchschnitt stärker befallen als die von den Infektionsstreifen weiter entfernten. Der Versuch, den Befallsgrad der Sporenfängerparzellen darüber hinaus in Abhängigkeit von der Anzahl Flugbrandähren aller unmittelbar umliegenden Parzellen mit

verschiedenen Methoden der Mittelwertbildung zu betrachten, führte jedoch zu keinem signifikanten Ergebnis. Für die Etablierung eines natürlichen Befalls im Zuchtgarten hatten die Infektionsstreifen eine größere Bedeutung zur Anhebung der Sporenkonzentration als die ungleichmäßig verteilt vorkommenden Parzellen mit mehr oder weniger Flugbrandähren. Da mit zunehmendem Anteil flugbrandresistenter Zuchtstämme über die drei Versuchsjahre hinweg auch die Anzahl flugbrandfreier Parzellen anstieg, nahm die Bedeutung der Infektionsstreifen für die natürliche Infektion ebenfalls weiter zu.

Die Hauptwindrichtung lag in den Anbaujahren 2007 und 2008 auf der Westseite des Versuchs, die in den zugeordneten Rasterplänen auf der jeweils rechten Seite anzusiedeln ist. Obwohl der Befall der Sporenfängerparzellen im Folgejahr für die Position der Parzelle im Vorjahr auf der Osthälfte des Zuchtgartens einen durchschnittlich höheren Befall aufwies (*Tabelle 2*), konnte aufgrund der großen Streuung der Einzelwerte dieser Unterschied statistisch nicht abgesichert werden. Die Position der Sporenfängerparzellen in Abhängigkeit von der Hauptwindrichtung war den Mittelwertvergleichen nach, bezogen auf die Unterteilung nach Osthälfte und Westhälfte, demnach von geringerer Bedeutung. Es ergab sich, dass in beiden Infektionsjahren keine Sporenfängerparzelle mehr als 5 Meter von einer Parzelle entfernt lag, in der mindestens eine Flugbrandähre zu finden war. Über den ganzen Zuchtgartenbereich hinweg fanden sich immer wieder Einzelparzellen oder Parzellengruppen mit Flugbrandähren. Offensichtlich konnten unabhängig von der Hauptwindrichtung auch solche Positionen im Zuchtgarten von Flugbrandsporen erreicht werden, die von den Flugbrandähren weiter entfernt waren.

Der natürlich mit Infektionsstreifen hervorgerufene Befall zeigte sich insbesondere in der Generation  $F_5$ , wo er im Zuchtgarten 2008 zu einer ausgeprägten Differenzierung von befallsfreien bis hoch befallenen Nachkommenschaften führte. In den Generationen ab  $F_6$  geben die Rasterpläne den Gesamtbefall pro Parzelle inklusive der künstlich inokulierten Ährennachkommenschaft wieder. Die *Tabellen 3* und *4* dokumentieren, wie viele Nachkommenschaften in der jeweiligen Generation nur aufgrund einer künstlichen Inokulation als anfällig erkannt wurden.

**Tabelle 1: Befall der Sporenfängerparzellen in Abhängigkeit von der Nähe zum Infektionsstreifen**

**Table 1: Infestation with loose smut in spore catching plots depending on neighbourhood to infection stripes**

Distance of plot related to smut infections stripes	next to it	further	next to it	further
Year	2007	2007	2008	2008
Number of plots (n)	7	30	28	32
Average loose smut infection in following year (%)	19.0**	9.4**	3.1**	1.2**
Standard deviation (%)	8.2	8.2	1.5	1.5

\*\* =  $P < 0.01$

**Tabelle 2: Befall der Sporenfängerparzellen in Abhängigkeit von der Hauptwindrichtung**

**Table 2: Infestation with loose smut in spore catching plots depending on main direction of wind (westwind)**

Position of plot in	east part	west part	east part	west part
Year	2007	2007	2008	2008
Number of plots (n)	20	17	34	26
Average loose smut infection in following year (%)	12.9	9.2	2.7	1.4
Standard deviation (%)	8.8	8.8	1.7	1.7

**Tabelle 3: Flugbrandbefall der Nachkommenschaften in den Generationen F<sub>5</sub>-F<sub>9</sub> im Zuchtgarten 2008****Table 3: Loose smut attack of descendants in generations F<sub>5</sub>-F<sub>9</sub> in the year 2008**

Generation generation	Nachkommenschaften descendants	mit Flugbrandbefall with loose smut	nur wegen Inokulation erkannt only recognized inoculated
F <sub>5</sub>	340 davon 0 inokuliert	169	
F <sub>6</sub>	196 davon 170 inokuliert	77	33
F <sub>7</sub>	61 davon 49 inokuliert	7	2
F <sub>8</sub>	11 davon 11 inokuliert	0	0
F <sub>9</sub>	9 davon 9 inokuliert	1	0
Neue Sorten/Stämme	28 inokuliert	25	11

**Tabelle 4: Flugbrandbefall der Nachkommenschaften in den Generationen F<sub>5</sub>-F<sub>9</sub> im Zuchtgarten 2009****Table 4: Loose smut attack of descendants in generations F<sub>5</sub>-F<sub>9</sub> in the year 2009**

Generation generation	Nachkommenschaften descendants	mit Flugbrandbefall with loose smut	nur wegen Inokulation erkannt only recognized inoculated
F <sub>5</sub>	437 davon 0 inokuliert	76	
F <sub>6</sub>	312 davon 201 inokuliert	73	44
F <sub>7</sub>	254 davon 133 inokuliert	43	7
F <sub>8</sub>	35 davon 31 inokuliert	0	0
F <sub>9</sub>	41 davon 9 inokuliert	0	0
Neue Sorten/Stämme	67 inokuliert	59	50

Der Flugbrandbefall in den Generationen F<sub>5</sub> bis F<sub>9</sub> aus den beiden Jahren 2008 und 2009 zeigte in Relation zum Gesamtumfang für das Jahr 2009 einen insgesamt niedrigeren Anteil Nachkommenschaften mit Flugbrandbefall in den Generationen F<sub>5</sub> bis F<sub>7</sub> (Tabelle 4). Auch bei der als Sporenfänger eingesetzten Sorte Lawina war der durchschnittliche Befall mit 2,1% im Jahr 2009 deutlich niedriger als der Durchschnittsbefall von 11,2 % im Jahr 2008. Der niedrigere Befall im Jahr 2009 ist wahrscheinlich auf eine geringere Neigung zur Offenblütigkeit aufgrund eines witterungsbedingt gestauchten Wachstums zur Zeit des Ährenschiebens im Anbau 2008 zurückzuführen. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass ein Erreichen des Vegetationspunktes durch die Pilzhyphen unmittelbar nach der Keimung der Gerste im Anbau 2009 mit widrigen Umständen verbunden war. Die Verteilungsdichte der Flugbrandähren in den Infektionsstreifen war 2008 mit 15 nur um 35% niedriger als 2007 mit 23 pro Parzellenäquivalent. Daran allein konnte es nicht gelegen haben. Die beiden Jahre zeigten ihrerseits im Ergebnis die enorme Schwankungsbreite im natürlichen Befall.

Der Anteil der auf natürliche Weise befallenen Nachkommenschaften in der Generation F<sub>5</sub> fällt 2009 mit 17% (76 von 437) sehr viel niedriger aus als im Vorjahr mit 50% (169 von 340). Selbst unter der Annahme, dass es sich ausschließlich um Nachkommenschaften mit der Einkreuzung einer monogen dominant vererbten Resistenz handeln würde, müssten statistisch gesehen 44% einen Befall aufweisen. Für das Jahr 2010 muss daher ein entsprechend höherer Anteil anfälliger Nachkommenschaften in F<sub>6</sub> erwartet werden. Von der Generation F<sub>5</sub> zur F<sub>6</sub> war der Anteil der Nachkommenschaften, die aufgrund eines natürlichen Befalls erkannt wurden, im Verhältnis zu denjenigen, die nur aufgrund einer Inokulation erkannt wurden in beiden Jahren in etwa gleich hoch. In der Generation F<sub>7</sub> wurden die meisten der noch anfälligen Nachkommenschaften aufgrund der natürlichen Infektion und nur noch vereinzelte Nachkommenschaften

aufgrund der Inokulation erkannt. In den Generationen F<sub>8</sub> und F<sub>9</sub> konnte auch mittels Inokulation keine anfällige Nachkommenschaft mehr auffindig gemacht werden. Unter nur natürlichen Befallsbedingungen wäre demnach eine einzige Generation unter Befall für eine Prüfung auf Resistenz noch nicht ausreichend gewesen.

In den zugrunde liegenden Untersuchungen brachte nur jede 10. künstlich inokulierte Ähre einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn über die Anfälligkeit des Zuchtstammes. Bei bis zu 500 inokulierten Ähren pro Vegetation ist dies gemessen am Ergebnis ein sehr hoher Aufwand, wenn zugleich über drei Generationen unter Flugbrandbefall selektiert werden kann. Die Hälfte des Aufwandes für künstliche Inokulationen fiel bei dem in dieser Untersuchung verfolgten Ansatz in der Generation F<sub>5</sub> an. Andererseits führte bei Neuzugängen (Sorten, Testzuchtstämme, genetische Ressourcen) die künstliche Inokulation zu einem schnelleren Ergebnis, weshalb in diesem Bereich stattdessen auf Infektionsstreifen verzichtet werden könnte, da eine Generation unter natürlichem Befall für eine abschließende Beurteilung prinzipiell nicht ausreichte.

Bemerkenswert ist, dass von den weitergeführten anfälligen Zuchtstämmen und Sorten nicht eine einzige aufgrund des natürlichen Befalls verloren gegangen ist. Immer fanden sich ausreichend viele Geschwisterpflanzen mit denen ein Fortbestand des Zuchtstammes gewährleistet werden konnte.

Da von den 60 Sporenfängerparzellen der Ernte 2008 zur Befallsermittlung eine Ertragsprüfung mit Parzellen von 6 m<sup>2</sup> in zwei Wiederholungen angelegt werden konnte, war es möglich den Ertrag in Abhängigkeit vom Befall zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass unter Ausschluss der am höchsten befallenen Herkunft mit den restlichen 59 Proben keine signifikante Korrelation ermittelt werden konnte. Demnach waren für die Ertragsbildung bei einem Befall bis 5% und einem Ertragsniveau von 20 dt/ha andere Faktoren



von bedeutenderem Einfluss als der Kornverlust durch mit Flugbrand befallene Ähren.

## Schlussfolgerungen

Die Untersuchungen haben deutlich gemacht, dass für die Züchtung auf Sommergerstenflugbrandresistenz einerseits auf Infektionsstreifen in späteren Generationen und im Bereich von Neuzugängen verzichtet werden kann und andererseits die personalaufwendige künstliche Inokulation auf Nachprüfungen ab der Generation  $F_7$  und die Prüfung von Neuzugängen beschränkt werden kann.

Mit dem Einfügen von Infektionsstreifen zur Etablierung eines Flugbrandbefalls über drei Generationen von  $F_4$  bis  $F_6$  kann der größte Teil anfälliger Zuchtstämme ausgeschieden werden. Gegenüber einer Züchtung unter Verwendung genetischer Marker kann bei diesem Verfahren mit jeder  $x$ -beliebigen Resistenzquelle gezüchtet werden und es kann parallel dazu mit der langfristig angelegten Entwicklung quantitativer Resistenzen unter Verwendung gering anfälliger Zuchtstämme begonnen werden.

Die für eine kontinuierliche ökologische Saatgutproduktion unverzichtbare Flugbrandresistenz kann mit dem hier entwickelten Ansatz verhältnismäßig kostengünstig zu

einem dauerhaften und nachhaltig verfolgten Zuchtziel gemacht werden. Jeder Zuchtbetrieb kann mit dem hier evaluierten Verfahren unmittelbar beginnen, sobald entsprechende Kreuzungsnachkommenschaften zur Prüfung anstehen. Von den ohnehin unverzichtbaren künstlichen Inokulationen bei Neuzugängen oder zur Nachprüfung abgesehen sind keine zusätzlichen Techniken erforderlich. Ob künftig entsprechende Sorten für eine Vermehrung im ökologischen Landbau zur Verfügung stehen werden, hängt lediglich davon ab, ob mit entsprechenden Kreuzungen und Selektionsprozessen begonnen wird.

## Danksagung

Das Vorhaben wurde im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (BÖL) gefördert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz in Deutschland unter dem Förderkennzeichen 06OE028.

## Literatur

MÜLLER KJ, 2005: Wird die Bedeutung von Flugbrand an Sommergerste überschätzt? Bericht über die 55. Arbeitstagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 23.-25. November 2004, pp 81-86. BAL Gumpenstein, Irdning.

# Strategien gegen Zwergsteinbrand (*Tilletia controversa*) und Steinbrand (*Tilletia caries*) im ökologischen Getreidebau

## Development of Strategies against Dwarf Bunt (*Tilletia controversa*) and Common Bunt (*Tilletia caries*) of Wheat in Organic Farming

M. Dressler<sup>1\*</sup>, B. Voit<sup>1</sup>, P. Büttner<sup>1</sup> und B. Killermann<sup>1</sup>

### Abstract

This research work is scoping on whether threshold values for dwarf bunt (*Tilletia controversa*) and common bunt (*Tilletia caries*) of wheat are sufficient for seed, or whether in future the infection potential in the soil will have to be considered additionally.

The multi-factorial field trials are performed in a split-plot design at 3 sites, each with susceptible and low-susceptible wheat and spelt cultivars at diverse infection levels and 4 replications. Furthermore an early- and a late-sowing variant of common bunt are tested. In order to obtain an infection of dwarf bunt, the soil infected variant was laid out in the experiment. The spore infestation is determined at the harvested crop and in the soil.

In the case of dwarf bunt a relation between the infection potential in the soil and at the harvested crop could be detected. Varietal differences could not be identified. Diffuse light is sufficient for infection with dwarf bunt.

For common bunt, the early-sowing variant shows a higher spore infestation at the harvested crops. The variety significantly influences the occurrence of infestation. The results confirm that common bunt infection from soil is possible. The main influence on common bunt infection is the weather during germination, i.e. rainfall and temperature.

### Einleitung und Zielsetzung

Im Öko-Landbau sind der Steinbrand (*Tilletia caries*) und der regional ab 400 m vorkommende Zwergsteinbrand (*Tilletia controversa*) die häufigsten Krankheiten (HUSS 2006). Besonders in Jahren mit günstigen Infektionsbedingungen treten die Krankheiten verstärkt auf.

Der trockene Herbst 2003 und das damit verzögerte Auflaufen des Getreides führten am Erntegut 2004 zu einem erhöhten Steinbrandbefall. Neben der Saatgutinfektion ist auch eine Infektion über den Boden möglich (KILLERMANN et al. 2008, VOIT und KILLERMANN 2007).

Die vorherrschenden Lichtverhältnisse unter der langandauernden Schneedecke des Winters 2005/2006 bei offenem Boden führten zu einem vermehrten Zwergsteinbrandbefall.

Ist das Erntegut stark von Brandsporen befallen, können diese Partien nicht als Saatgut, Lebens- und als Futtermittel verwendet oder vermarktet werden.

Im Rahmen des Forschungsprojektes wird untersucht inwieweit die Schwellenwerte für Zwergsteinbrand und Steinbrand am Saatgut ausreichen, oder ob künftig das Sporenpotenzial im Boden stärker berücksichtigt werden muss. Bei Steinbrand liegt der Schwellenwert für Saatgut in Bayern bei 20 Sporen/Korn, während für Zwergsteinbrand noch kein Schwellenwert existiert. Für das Sporenpotenzial im Boden gibt es noch keine Schwellenwerte.

### Material und Methoden

Da es sich um ein Forschungsvorhaben auf nationaler Ebene handelt, wurden Öko-Praxisflächen, die bereits einen Brandsporenbesatz im Boden aufwiesen, über Deutschland verteilt ausgewählt.

Die Versuche wurden an Standorten in Bayern (BY), Baden-Württemberg (BW), Sachsen (SN), Nordrhein-Westfalen (NRW) sowie in Oberösterreich (OÖ) durchgeführt. Der Versuchsstandort in Oberösterreich wurde gewählt, da er als sehr sicher für das Auftreten von Zwergsteinbrand gilt.

Die Anlage der mehrfaktoriellen Feldversuche (Saatzeit, Sorte, Saatgutinfektionsstufe) erfolgte als randomisierte Streifenanlage mit vier Wiederholungen. Die Parzellengröße betrug je nach Standort 10-13 m<sup>2</sup>. Neben der Kontrolle wurde von jeder Sorte homogen infiziertes Saatgut (20 Sporen/Korn bzw. 100 Sporen/Korn) ausgesät.

Das Auftreten von Zwergsteinbrand ist sehr stark witterungsabhängig, daher wurde an den drei Standorten in Bayern, Baden-Württemberg und Oberösterreich zusätzlich jeweils eine Variante mit künstlicher Bodeninfektion (0,5 g Sporen/m<sup>2</sup>) angelegt. Die Versuche für Zwergsteinbrand wurden in unterschiedlichen Höhenlagen (300 bis 880 m über NN), mit einer als anfällig (A) sowie einer als weniger anfällig (B) geltenden Winterweizen- und Dinkelsorte angebaut.

Die Steinbrandversuche wurden mit einer anfälligen Winterweizensorte (A) und einer weniger anfällig geltenden Sorte (E), zu einem frühen und einem späten Saatzeitpunkt in Bayern, Baden-Württemberg, Sachsen und Nordrhein-Westfalen angebaut. Witterungsbedingt fand zur Saat 2007

<sup>1</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft Freising, Vöttinger Straße 38, D-85354 FREISING

\* Ansprechpartner: Markus DRESSLER, markus.dressler@lfl.bayern.de

in Sachsen nur eine Früh- und in Nordrhein-Westfalen nur eine Spätsaat statt.

Während der Vegetation wurden mehrmals Bonituren auf den Befall mit Brandkrankheiten durchgeführt. Am Erntegut wurde der Brandsporenbesatz nach der ISTA Methode (Handbook on Seed Health Testing, Working Sheet No 53) bestimmt. Um eine Aussage über die Entwicklung des Sporenpotenzials im Boden geben zu können, wurde der Boden nach der Saat und nach der Ernte untersucht. Die Bestimmung des Sporenpotenzials im Boden wurde ebenfalls nach der ISTA Methode durchgeführt. Vorher erfolgte das Auswaschen der Sporen aus dem Boden mit dem Nass-Siebverfahren.

## Ergebnisse und Diskussion

Der Zwergsteinbrand infiziert überwiegend über den Boden während der Bestockung des Getreides. Als infektionsfördernd gilt ein nicht gefrorener Boden bei niedrigen Temperaturen (0°C bis 5°C) sowie diffuse Lichtverhältnisse, wie sie unter Schnee vorzufinden sind.

Trotz fehlender Schneedecke im Winter 2007/2008, reichten scheinbar die diffusen Lichtverhältnisse (Nebel, bewölckter Himmel) während der Bestockung aus, um an allen Standorten einen unterschiedlich hohen Zwergsteinbrandbefall zu verursachen (Abbildung 1). Wie zu erwarten, war der Brandsporenbesatz am Erntegut bei der Variante Bodeninfektion am höchsten. Dieser wies am Standort in Oberösterreich signifikant den höchsten Befall auf. Die als

weniger anfällig geltende Weizensorte (B) konnte sich an keinem Standort und keiner Variante deutlich von der als anfällig geltenden Sorte (A) absetzen. An den Standorten Bayern und Baden-Württemberg traten im Versuchsjahr 2007/2008 zwischen den Varianten keine signifikanten Unterschiede auf.

Das Sporenpotenzial im Boden war an den Standorten und in den Varianten sowohl bei der Saat 2007 als auch nach der Ernte 2008 inhomogen verteilt.

Dabei zeigte sich, dass der Befall stark vom Standort abhängig ist. Ein Zusammenhang zwischen dem Sporenpotenzial im Boden zur Saat und am Erntegut war im Versuchsjahr 2007/2008 nicht erkennbar. Bei einem Befallsaufreten kam es zu einem Ansteigen des Sporenpotenzials im Boden (Tabelle 1).

Das Erntegut des Dinkels zeigte gegenüber dem Winterweizen an allen Standorten und Varianten der Ernte 2008 einen deutlich niedrigeren Befall. Selbst in der Variante Bodeninfektion war der Befall in Oberösterreich bei der anfälligen Sorte (A) nur bei 78 Sporen/Korn. Im Versuchsjahr 2007/2008 waren zwischen den Standorten, Behandlungen und Sorten keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

Aufgrund des insgesamt geringen Infektionsniveaus sind die Schwankungen zwischen den Standorten, Infektionsstufen und Sorten gering. Durch den niedrigen Befall zeigte sich keine Tendenz des Sporenpotenzials im Boden zur Saat 2007 und nach der Ernte 2008.

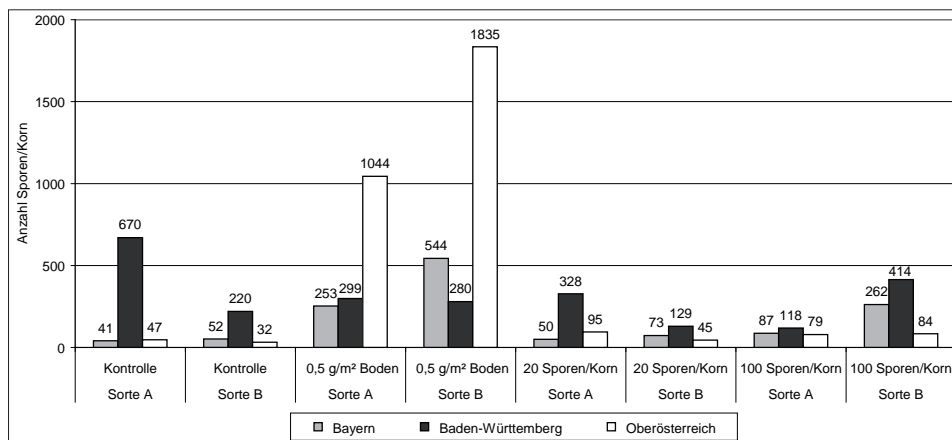


Abbildung 1: Zwergsteinbrandbesatz am Erntegut 2008 bei Winterweizen auf den Standorten Bayern, Baden-Württemberg und Oberösterreich bei der Bodeninfektion und den unterschiedlichen Saatgutinfektionsstufen

Tabelle 1: Zwergsteinbrandpotenzial im Boden bei Winterweizen zum Zeitpunkt der Saat 2007 und nach der Ernte 2008 an den Standorten Bayern, Baden-Württemberg und Oberösterreich bei der Bodeninfektion und unterschiedlichen Saatgutinfektionsstufen

Sorte	Behandlung	Bayern		Baden-Württemberg		Oberösterreich	
		Anzahl Sporen im Boden* zur Saat	nach Ernte	Anzahl Sporen im Boden* zur Saat	nach Ernte	Anzahl Sporen im Boden* zur Saat	nach Ernte
Sorte A	Kontrolle	174	159	73	130	29	101
Sorte B	Kontrolle	213	216	145	288	15	144
Sorte A	0,5 g Sporen/m² Bodeninfektion	349	677	87	202	102	518
Sorte B	0,5 g Sporen/m² Bodeninfektion	547	835	245	101	260	519
Sorte A	20 Sporen/Korn	217	1620	130	72	7	72
Sorte B	20 Sporen/Korn	151	692	231	15	0	15
Sorte A	100 Sporen/Korn	243	634	217	72	7	0
Sorte B	100 Sporen/Korn	216	489	84	245	15	0

\* Die Angaben erfolgen als Anzahl Sporen in 10 g Boden

Der hohe Sporenbesatz am Erntegut 2009 bei Winterweizen zeigte, dass es aufgrund des schneereichen Winters und offenen Bodens am Standort in Baden-Württemberg, zu einem starken Zwergsteinbefall kam. Die Variante Bodeninfektion hatte bei der weniger anfälligen Sorte (B) mit über 14.200 Sporen/Korn signifikant den höchsten Befall, während bei den anderen Infektionsstufen der Befall zwischen 1.100 und 3.700 Sporen/Korn lag. Zwischen den beiden Sorten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Bereits bei der Ährenbonitur war dieser starke Befall deutlich erkennbar. So wurden zum Beispiel bei dem weniger anfälligen Winterweizen (B) in Baden-Württemberg bei der Bodeninfektion 22 % befallene Brandähren festgestellt.

In Bayern waren die Voraussetzungen für einen natürlichen Befall zur Ernte 2009 nicht gegeben. Nur bei der Bodeninfektion wies die anfällige Sorte (A) mit rund 2.500 Sporen/Korn signifikant den höchsten Befall auf. Bei den Saatgutinfektionsstufen hatte die Variante mit 100 Sporen/Korn sowohl bei der anfälligen Sorte (A) als auch bei der weniger anfälligen Sorte (B) mit über 400 Sporen/Korn den höchsten Befall. Deutliche Sortenunterschiede konnten nicht festgestellt werden. Aufgrund von Hagelschaden konnten die Versuche in Oberösterreich nicht beerntet werden.

Das Sporenpotenzial im Boden war zur Saat des Weizens an den beiden Standorten unterschiedlich hoch und wieder inhomogen verteilt. In Baden-Württemberg lag das Sporenpotenzial zur Saat 2008, außer bei der Bodeninfektion, im Mittel bei 89 Sporen in 10 g Boden, während in Bayern im Mittel 25 Sporen in 10 g Boden gefunden wurden. Nur in Bayern war die künstliche Bodeninfektion zur Saat 2008 gegenüber den anderen Varianten signifikant. Der starke Zwergsteinbrandbefall am Standort Baden-Württemberg führte zu einem signifikanten Anstieg des Sporenpotenzials im Boden nach der Ernte. Das höchste Sporenpotenzial nach der Ernte hatte die anfällige Sorte (A) bei der Bodeninfektion mit 41.400 Sporen in 10 g Boden. Somit nahm in dieser Variante das Sporenpotenzial gegenüber dem Potenzial zur Saat um mehr als das 1.300-fache zu. Bei der Saatgutinfektionsstufe 20 Sporen/Korn bei der Sorte (A) wurde in Baden-Württemberg der höchste Befall mit 14.000 Sporen in 10 g Boden festgestellt, was eine Zunahme gegenüber dem Sporenpotenzial zur Saat um mehr als das 160-fache bedeutet. Zwischen den Sorten und den Saatgutbehandlungen waren keine deutlichen Tendenzen ableitbar.

Durch das geringe Befallsauftreten beim Weizen am Standort in Bayern, war auch die Zunahme des Sporenpotenzials im Boden nach der Ernte gering. Nur die Bodeninfektion wies signifikant das höchste Sporenpotenzial im Boden auf. So wurden bei der anfälligen Sorte (A) 5.600 Sporen in 10 g Boden ermittelt, was eine Zunahme gegenüber zur Saat um das 6-fache bedeutet.

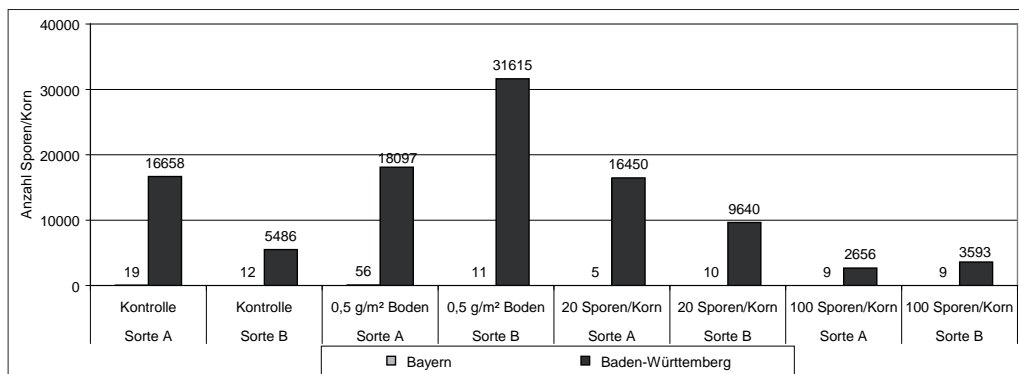
Das Erntegut des Dinkels 2009 zeigte am Standort in Baden-Württemberg einen noch stärkeren Befall als der Weizen. Die Variante Bodeninfektion war mit rund 32.000 Sporen/Korn bei der weniger anfälligen Sorte (B) am stärksten befallen (*Abbildung 2*). In Bayern waren die Witterungsbedingungen für einen natürlichen Befall mit Zwergsteinbrand nicht gegeben, deshalb war der Befall ähnlich gering wie im Vorjahr 2008. Bei der Bodeninfektion lag der Befall der anfälligen Sorte (A) bei nur 56 Sporen/Korn. Signifikante Sortenunterschiede konnten an beiden Standorten nicht festgestellt werden.

Das vorhandene Sporenpotenzial im Boden beim Dinkel am Standort Baden-Württemberg war zur Saat um das 3-fache höher als am Standort Bayern. Aufgrund der künstlichen Bodeninfektion wies an beiden Standorten diese Variante nach der Saat signifikant das höchste Sporenpotenzial auf. Nach der Ernte 2009 nahm das Sporenpotenzial im Boden bei der anfälligen Sorte (A) in Baden-Württemberg signifikant zu. Bei den Behandlungen hingegen waren an diesem Standort keine deutlichen Unterschiede erkennbar. In Bayern hatte die Variante Bodeninfektion nach der Ernte den signifikant höchsten Befall (*Tabelle 2*). Zwischen den beiden Sorten konnten an diesem Standort keine Unterschiede festgestellt werden.

Die Infektion mit Steinbrand erfolgt während der Keimung des Getreides. Das Temperaturoptimum für die Infektion liegt bei ca. 10°C. Weicht die Temperatur deutlich ab, sinkt die Infektionsrate. Da die Infektion während der Keimung erfolgt und sehr temperaturabhängig ist, wurden eine Früh- und Spätsaatvariante durchgeführt.

Durch den trockenen Boden im Herbst 2007 nach der Saat am Standort in Bayern und dem damit verbundenem langsamen Auflaufen des Weizens bei der Frühsaat, kam es zu einem starken Befall am Erntegut 2008.

An allen Standorten und Saatzeiten wies die Variante 100 Sporen/Korn bei der anfälligen Sorte (A) den höchsten Befall auf. Am stärksten war das Erntegut bei der Variante



**Abbildung 2:** Zwergsteinbrandbesatz am Erntegut 2009 bei Dinkel an den Standorten Bayern und Baden-Württemberg bei der Bodeninfektion und den unterschiedlichen Saatgutinfektionsstufen

**Tabelle 2: Zwergsteinbrandpotenzial im Boden bei Dinkel zum Zeitpunkt der Saat 2008 und nach der Ernte 2009 an den Standorten Bayern und Baden-Württemberg bei der Bodeninfektion und unterschiedlichen Saatgutinfektionsstufen**

Sorte	Behandlung	Bayern		Baden-Württemberg	
		Anzahl Sporen im Boden* zur Saat	nach Ernte	Anzahl Sporen im Boden* zur Saat	nach Ernte
Sorte A	Kontrolle	30	72	101	24060
Sorte B	Kontrolle	0	29	72	3744
Sorte A	0,5 g Sporen/m <sup>2</sup> Bodeninfektion	245	346	274	65772
Sorte B	0,5 g Sporen/m <sup>2</sup> Bodeninfektion	302	562	116	2808
Sorte A	20 Sporen/Korn	43	44	58	3546
Sorte B	20 Sporen/Korn	58	101	29	1872
Sorte A	100 Sporen/Korn	29	58	187	26352
Sorte B	100 Sporen/Korn	43	144	144	792

\* Die Angaben erfolgen als Anzahl Sporen in 10 g Boden

100 Sporen/Korn mit über 42.000 Sporen/Korn am Standort in Bayern befallen (*Abbildung 3*). Die gegenüber Steinbrand anfällige Sorte (A) war an allen Standorten und Infektionsstufen stärker befallen als die weniger anfällige Sorte (E). Anhand der Kontrolle (befallsfreies Z-Saatgut) konnte bestätigt werden, dass bei vorhandenem Sporenpotenzial im Boden, bei Steinbrand eine Infektion über den Boden erfolgt (KILLERMANN et al. 2008, VOIT und KILLERMANN 2007).

Aufgrund der niedrigen Auflauftemperaturen bei der Spätsaat sank an allen Standorten der Befall am Erntegut (*Abbildung 4*). In Baden-Württemberg war dieser Rückgang signifikant niedriger gegenüber der Frühsaat. Weiterhin hatte der Standort in Bayern mit über 16.000 Sporen/Korn den höchsten Befall. Durch den späten Saattermin (Ende November) in Nordrhein-Westfalen, blieb bedingt durch die niedrigen Keimtemperaturen, sogar eine Infektion bei der anfälligen Sorte (A) aus.

An allen Standorten war das Sporenpotenzial im Boden zur Saat 2007 unterschiedlich hoch und inhomogen verteilt. Dabei zeigte sich, dass ein hohes Infektionspotenzial im Boden, wie am Standort in Sachsen, mit über 2.100 Sporen in 10 g Boden, nicht automatisch auch zu einem hohen Befall am Erntegut führte (*Tabelle 3, Abbildung 3*). Entscheidend für das Befallsauftreten war der Witterungsverlauf während der Keimung. Ist das Auflaufen des Getreides durch Trockenheit, wie am Standort in Bayern verzögert, führt dies zu einer langen Infektionszeit mit Steinbrand.

Nach der Ernte 2008 wurde wieder am sächsischen Standort mit rund 1.400 Sporen in 10 g Boden das höchste Sporen-

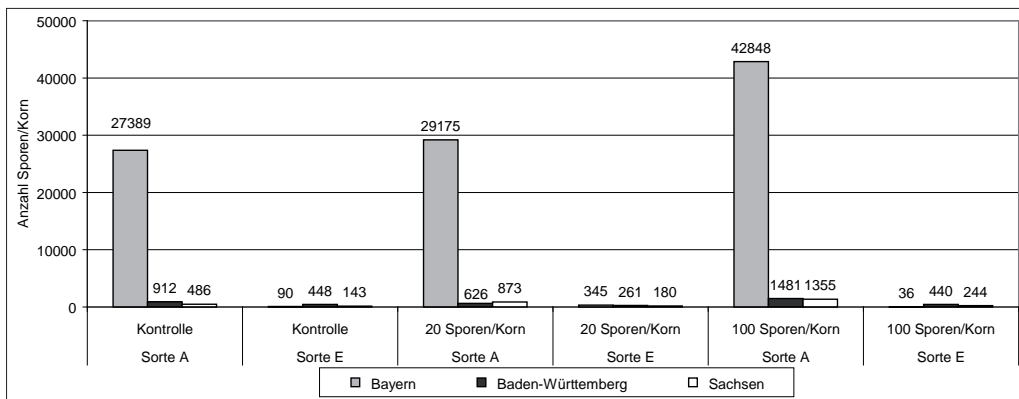
potenzial festgestellt. Aufgrund des geringen Befalls am Erntegut kam es nicht zu einer Zunahme des Sporenpotenzials im Boden, sondern zeigte eher eine abnehmende Tendenz (*Tabelle 3*).

Auch bei der Spätsaat war das Sporenpotenzial im Boden zur Saat an den Standorten, Bayern und Baden-Württemberg ähnlich hoch wie bei der Frühsaat, in Nordrhein-Westfalen war der maximale Besatz bei 43 Sporen in 10 g Boden. Da an allen Standorten der Befall am Erntegut (Spätsaat) gering war, führte dies zu keiner nennenswerten Zunahme des Sporenpotenzials im Boden.

Die Untersuchungen des Erntegutes 2009 bei Steinbrand zeigten, dass bei der Frühsaat in Sachsen, aufgrund der günstigen Infektionstemperaturen (um 10°C) während des Auflaufens Mitte Oktober, ein hoher Befall auftrat. Den signifikant höchsten Befall am Standort in Sachsen wies die Variante 100 Sporen/Korn bei der anfälligen Sorte (A) mit über 12.000 Sporen/Korn auf (*Abbildung 5*). In Bayern führten nach der Saat Anfang Oktober 2008 die deutlich höheren Tagestemperaturen mit mehr als 15°C zu einem zügigen Auflaufen und somit geringem Befall am Erntegut.

Von allen Standorten unterschied sich die Variante 100 Sporen/Korn in Nordrhein-Westfalen signifikant. Das Erntegut der weniger anfälligen Sorte (E) zeigte, außer in Baden-Württemberg, an allen Standorten einen signifikant niedrigeren Sporenbesatz.

Durch den späteren Saattermin 2008 sank an allen Standorten der Sporenbesatz am Erntegut 2009, signifikant war er nur in Sachsen (*Abbildung 6*).



**Abbildung 3: Steinbrandbesatz am Erntegut 2008 bei Winterweizen auf den Standorten Bayern, Baden-Württemberg und Sachsen bei den unterschiedlichen Saatgutinfektionsstufen und Frühsaat**

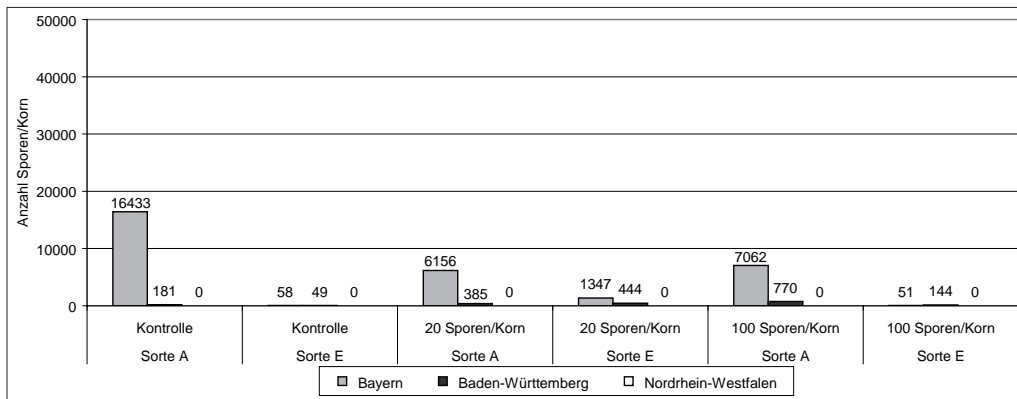


Abbildung 4: Steinbrandbesatz am Erntegut 2008 bei Winterweizen auf den Standorten Bayern, Baden-Württemberg und Nordrhein-Westfalen bei unterschiedlichen Saatgutinfektionsstufen und Spätsaat

Tabelle 3: Steinbrandpotenzial im Boden bei Winterweizen- Frühsaat zum Zeitpunkt der Saat 2007 und nach der Ernte 2008 auf den Standorten Bayern, Baden-Württemberg und Sachsen bei den unterschiedlichen Saatgutinfektionsstufen

Sorte	Behandlung	Bayern		Baden-Württemberg		Sachsen	
		Anzahl Sporen im Boden* zur Saat	nach Ernte	Anzahl Sporen im Boden* zur Saat	nach Ernte	Anzahl Sporen im Boden* zur Saat	nach Ernte
Sorte A	Kontrolle	44	245	245	43	1901	936
Sorte E	Kontrolle	0	173	145	86	662	746
Sorte A	20 Sporen/Korn	29	159	145	101	1511	1383
Sorte E	20 Sporen/Korn	115	216	86	44	907	705
Sorte A	100 Sporen/Korn	44	130	116	73	2145	490
Sorte E	100 Sporen/Korn	58	123	173	29	1469	432

\* Die Angaben erfolgen als Anzahl Sporen in 10 g Boden

Das Sporenpotenzial im Boden zur Saat 2008 war am sächsischen Standort wieder am höchsten. So wurden bei der Frühsaat bis zu 1.200 Sporen in 10 g Boden nachgewiesen (Tabelle 4). Aufgrund des hohen Sporenpotenzials und günstigen Infektionsbedingungen, kam es am Standort in Sachsen zu einem starken Befall bei der Frühsaat und somit zu einem signifikanten Anstieg des Sporenpotenzials im Boden nach der Ernte. Durch das hohe Befallsaufreten nahm das Sporenpotenzial bei der anfälligen Sorte (A) nach der Ernte im Mittel um mehr als das 10-fache gegenüber dem Ausgangspotenzial zur Saat zu. Auch bei der Spätsaat hatte der sächsische Standort nach der Saat mit über 1.600 Sporen in 10 g Boden das höchste Sporenpotenzial. Aufgrund der niedrigen Keimtemperatur kam es zu einem geringen Befall. Der hohe Ausgangsbesatz sank bei allen Varianten

nach der Ernte signifikant auf unter 300 Sporen in 10 g Boden. Wie bereits im Erntejahr 2008, in dem auch nur ein geringer Befall in Sachsen auftrat, war nach der Ernte 2009 das Sporenpotenzial zwischen 25 % und 90 % niedriger als zur Saat. An den anderen Standorten, die einen sehr geringen Befall im Boden aufwiesen, traten keine nennenswerten Unterschiede zwischen dem Sporenpotenzial zur Saat und nach der Ernte auf.

### Zusammenfassung

Anhand der Ergebnisse lässt sich beim Zwergsteinbrand sagen, dass für einen natürlichen geringen Befall diffuse Lichtverhältnisse wie Nebel bei offenem Boden ausreichen. Bei günstigen Infektionsbedingungen, wie sie durch die langandauernde Schneedecke bei offenem Boden am

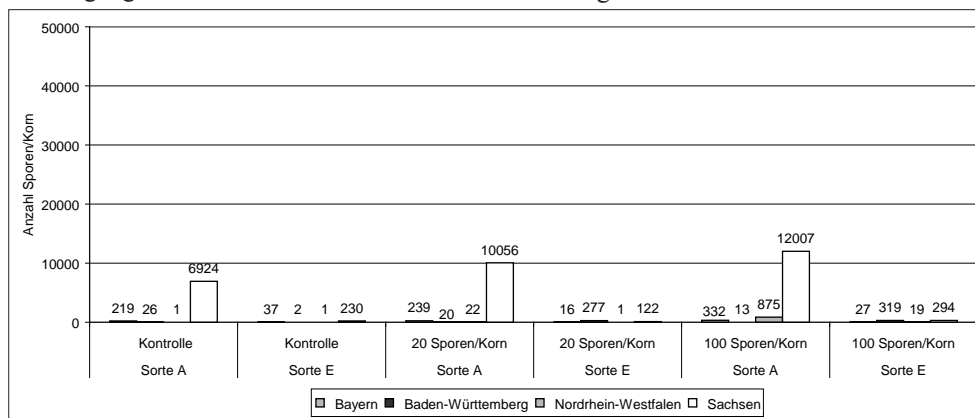


Abbildung 5: Steinbrandbesatz am Erntegut 2009 bei Winterweizen auf den Standorten Bayern, Baden-Württemberg, Nordrhein-Westfalen und Sachsen bei unterschiedlichen Saatgutinfektionsstufen und Frühsaat

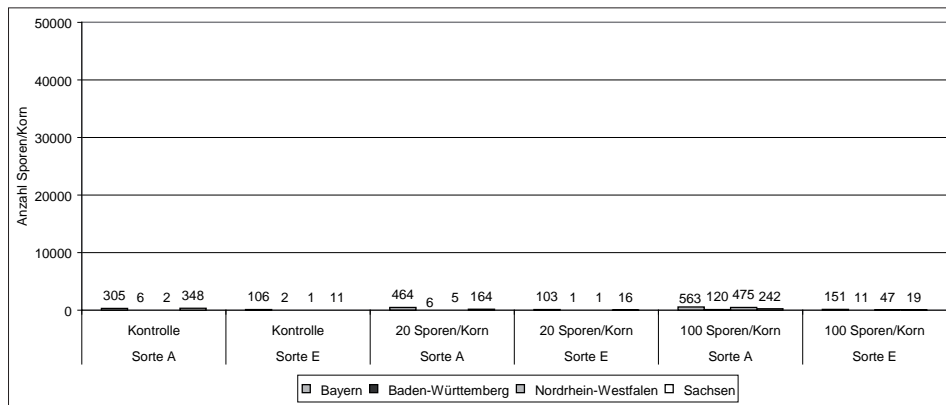


Abbildung 6: Steinbrandbesatz am Erntegut bei Winterweizen auf den Standorten Bayern, Baden-Württemberg, Nordrhein-Westfalen und Sachsen bei unterschiedlichen Saatgutinfektionsstufen und Spätsaat

Tabelle 4: Steinbrandpotenzial im Boden bei Winterweizen bei der Fröhsaat zum Zeitpunkt der Saat 2008 und nach der Ernte 2009 an den Standorten Bayern, Nordrhein-Westfalen und Sachsen bei den unterschiedlichen Saatgutinfektionsstufen

Sorte	Behandlung	Bayern		Nordrhein-Westfalen		Sachsen	
		Anzahl Sporen im Boden* zur Saat	nach Ernte	Anzahl Sporen im Boden* zur Saat	nach Ernte	Anzahl Sporen im Boden* zur Saat	nach Ernte
Sorte A	Kontrolle	58	29	0	0	943	13392
Sorte E	Kontrolle	15	58	0	43	968	418
Sorte A	20 Sporen/Korn	15	72	0	86	1170	10236
Sorte E	20 Sporen/Korn	29	29	0	43	907	1176
Sorte A	100 Sporen/Korn	15	130	0	58	1206	29376
Sorte E	100 Sporen/Korn	15	72	0	29	792	1075

\* Die Angaben erfolgen als Anzahl Sporen in 10 g Boden

Standort in Baden-Württemberg (2008/2009) vorlagen, führte dies bei einem Sporenpotenzial von ca. 50 Sporen in 10 g Boden zu einem starken Befall am Erntegut. Wie hoch das ausgebrachte Saatgut infiziert war, spielte dabei keine entscheidende Rolle mehr. Sortenunterschiede konnten nicht beobachtet werden. Das heißt, für die Weizenzüchtung gibt es auf diesem Gebiet noch ein großes Betätigungsfeld. Auf den Befall mit Zwergsteinbrand hat der Landwirt derzeit wenig Möglichkeit der Einflussnahme, weil er die Witterung im Winter nicht abschätzen kann und derzeit keine tolerante oder resistente Sorte am Markt ist. Für Betriebe die bereits Zwergsteinbrandbefall hatten, ist ein Grenzwert für das Infektionspotenzial im Boden durchaus sinnvoll, weil derzeit keine andere Möglichkeit besteht, einigermaßen sicher Weizen zu erzeugen, der frei von Zwergsteinbrand ist. Ein Schwellenwert lässt sich nach einem 1-jährigen Ergebnis noch nicht festlegen.

Die Ergebnisse bei Steinbrand zeigen, dass nicht der Brandsporenbesatz am Saatgut bzw. das Sporenpotenzial im Boden ausschlaggebend für den Befall ist. Entscheidend für das Auftreten ist die Witterung. Trockene Witterung nach der Saat oder Temperaturen zwischen 5 und 10°C sind ideale Infektionsbedingungen für den Steinbrand. Die Saatzeit nach der Bodenfeuchte anzupassen ist für den Landwirt möglich. Schwieriger gestaltet sich die Einschätzung der Keimtemperatur. Nach zwei vorliegenden Versuchsjahren hat sich gezeigt, dass hoher Steinbrandbefall stets zum frühen Saattermin auftrat und niemals bei später Saat. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die Infektion vom Boden erfolgen kann. Dem Steinbrandbefall kann mit einer gezielten Sortenwahl entgegengewirkt werden. Die zwei-

jährigen Ergebnisse zeigen, dass die Sortenwahl signifikant über das Befallsauftreten entscheidet. Zur Aussaat sollte nur gesundes Z-Saatgut verwendet werden, den je höher das ausgesäte Saatgut bereits mit Brandsporen befallen ist, umso höher ist der Befall im nächsten Jahr beim Erntegut. Ziel des Weizenanbaus muss sein, das Sporenpotenzial im Boden und am Erntegut so gering wie möglich zu halten. Für einen Grenzwert im Boden besteht derzeit keine Notwendigkeit.

## Danksagung

Mein Dank gilt allen, am Projekt beteiligten Landwirten, Versuchsanstellern, Kooperations- und Diskussionspartnern sowie Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft. Besonderer Dank geht an die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in Bonn für die finanzielle Förderung dieses Projektes.

## Literatur

- HUSSH, 2006: Zwergsteinbrand: ein ernstes Problem. Bio-Austria - Neues aus der Landesorganisation Niederösterreich, 12-13. [http://www.raumberg-gumpenstein.at/cms/index.php?option=com\\_content&task=view&id=166&Itemid=199](http://www.raumberg-gumpenstein.at/cms/index.php?option=com_content&task=view&id=166&Itemid=199), (Abruf 01.09.2008).
- KILLERMANN B, VOIT B., BÜTTNER P, 2008: Brandkrankheiten bei Weizen - Erfahrungen und Ergebnisse aus der Saatgutuntersuchung und Stand der derzeitigen Diskussion. 41-44 Tagungsband der 58. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 20.-22. November 2007, Raumberg-Gumpenstein.
- VOIT B, KILLERMANN B, 2007: Steinbrand (*Tilletia caries*) bei Weizen - Erfahrungen und Ergebnisse aus der Saatgutuntersuchung. VDLUFA Schriftenreihe Bd. 62/2007, 563-567.

## The *Fusarium* mycotoxin zearalenone inhibits Hsp90 ATPase activity and is inactivated *in planta* by glucosylation and sulfatation

Juan Antonio Torres Acosta<sup>1</sup>, Franz Berthiller<sup>2</sup>, Gerlinde Wiesenberger<sup>1</sup>, Rudolf Mitterbauer<sup>1</sup>, Ulrike Werner<sup>1</sup>, David Merz<sup>1</sup>, Marie-Theres Hauser<sup>1</sup>, Mehrdad Shams<sup>2</sup>, Rudolf Krska<sup>2</sup> and Gerhard Adam<sup>1\*</sup>

### Abstract

The *Fusarium* mycotoxin zearalenone (ZON) is well known for its estrogenic activity in animals. The role of ZON in plant-pathogen interaction was previously unclear. We have identified a prominent target for zearalenone: heat shock protein 90 (Hsp90). Zearalenone and, more strongly,  $\beta$ -zearalenol (bZOL) inhibit Hsp90 ATPase activity *in vitro*. ZON was found to be rapidly converted into ZON-4-O-glucoside and ZON-4-sulfate in *Arabidopsis* and other plants. Both conjugates do not have inhibitor activity in the Hsp90 *in vitro* assay. Hsp90 plays a prominent role in plant pathogen interaction and is necessary for disease resistance. Yet previous results with *Fusarium* gene disruption mutants deficient in ZON biosynthesis indicate that ZON is not a relevant virulence factor. Possible reasons for these conflicting results are discussed.

### Keywords

*Fusarium graminearum*, mycotoxin, zearalenone

### Introduction

The resorcylic acid lactone zearalenone is produced by many *Fusarium* species (e.g. members of the *F. graminearum* species complex, *F. pseudograminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. crookwellense/cerealis*, *F. semitectum*). ZON received most scientific attention due to its ability to bind with high affinity to the estrogen receptor protein in animals and humans and to act as powerful xenoestrogen (KUIPER-GOODMAN et al. 1987). Due to this hormone activity regulatory limits in food are low (e.g. 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in infant food (EC 1881/2006 and 1126/2007)). In comparison, high concentrations (easily exceeding 20  $\text{mg kg}^{-1}$ ) can occur in infected plant material, especially in corn. Plants do not have an estrogen receptor, and it was previously unclear whether ZON has biological functions in plants. We have used the model system *Arabidopsis thaliana* to elucidate the biological function of ZON.

### Material and methods

*A. thaliana* seedlings (ecotype Columbia) grown in liquid MS medium were treated with 50  $\mu\text{M}$  ZON and gene ex-

pression was monitored using the Affymetrix ATH1 Gene chip (for details see WERNER 2005). The yeast heat shock protein 90 homolog (product of the *HSP82* gene) was expressed in *Escherichia coli* and affinity purified using a 6 $\times$ HIS tag. Further purification was achieved by gel filtration (Sephadex G25) and ion exchange (Resource Q1). ATPase activity of the purified protein was measured by a nonradioactive phosphate release assay based on malachite green formation (ROWLANDS et al. 2004). ZON and ZOL conjugates were purified by preparative HPLC from *Fusarium* cultures (ZON-4-sulfate) or from ZON treated yeast cultures expressing an *Arabidopsis* glucosyltransferase (ZON-4-O-glucosid and ZOL-glucosides) as previously described (POPPENBERGER et al. 2006, BERTHILLER et al. 2009a). Radicol was purified from rice cultures of *Nectria radicolica* MA1224.

### Results and discussion

Treatment of *Arabidopsis* with ZON led to an at least 2-fold change in gene expression (WERNER 2005, WERNER et al., unpublished) of 495 genes after 2 hours. The strongly upregulated genes included multiple candidate genes with a role in ZON detoxification, such as drug efflux pumps (e.g. *AtPDR12* induced 14 $\times$ ), 9 genes encoding glutathione-S-transferases (GSTs) and 3 genes coding for UDP-glucosyltransferases (UGTs). Strongly induced were also several genes encoding small heat shock proteins. In contrast, 46 genes with a predicted role in cell wall related functions (remodeling/reinforcement) were strongly downregulated, especially peroxidases, consistent with a negative role of ZON in cell wall mediated plant defense. ZON furthermore was found to be able to suppress the short-root phenotype triggered by a mutation in a cellulose biosynthetic gene leading to constitutive overproduction of ethylene and jasmonic acid (WERNER et al. unpublished). Consistent with the transient transcriptome response, rapid metabolism of ZON into glucose and sulfate conjugates (and further unknown metabolites) was observed (BERTHILLER et al. 2006).

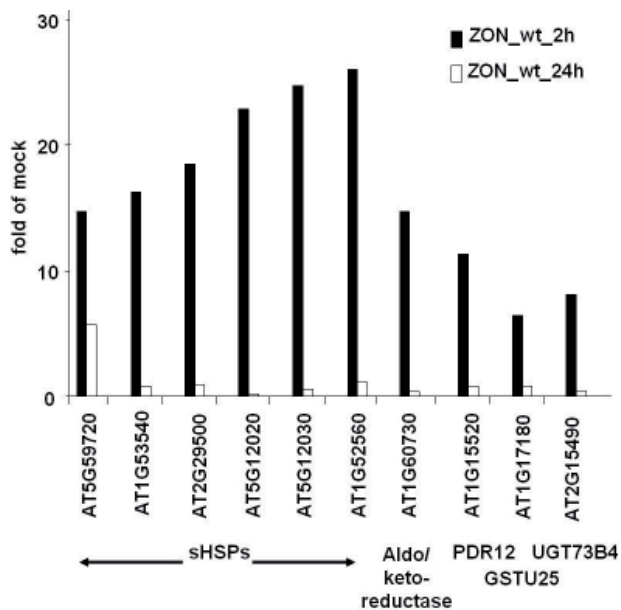
The finding that ZON induced 7 genes (6.4 $\times$  to 47 $\times$ ), which code for small heat shock proteins was intriguing. Examples are shown in *Figure 1*. Several of the yeast genes showing the highest similarity to the ZON induced small

<sup>1</sup> BOKU University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Department of Applied Genetics and Cell Biology, Muthgasse 18, A-1190 VIENNA

<sup>2</sup> BOKU, Department for Agrobiotechnology, IFA Tulln, Center for Analytical Chemistry and Christian Doppler Laboratory for Mycotoxin Research, Konrad-Lorenz-Straße 20, A-3430 TULLN

\* Ansprechpartner: Univ.Prof. Dr. Gerhard ADAM, gerhard.adam@boku.ac.at





**Figure 1:** Expression analysis of ten highly ZON induced genes in *Arabidopsis* Col-0 (wt). These include several small heat shock proteins (sHSPs), an aldo/keto reductase, an ABC transporter family gene (*PDR12*), a glutathione-S-transferase (*GSTU25*) and a glycosyltransferase (*UGT73B4*). Data are extracted from microarray experiments and presented relative to the respective mock controls.

HSPs from *Arabidopsis* were found to be Hsp90 interactors in systematic screens. In *Arabidopsis* specifically one of seven HSP90 genes, the *AtHSP90-1* gene was upregulated 3.7× by treatment with ZON. Furthermore, we noticed the structural similarity of zearalenone with radicicol, a known inhibitor of Hsp90 ATPase (for review see SGOBBA and RASTELLI 2009), which is produced by *Nectria radicicola* (MIRINGTON et al. 1965) and other fungi.

To test the hypothesis that ZON is an inhibitor of Hsp90 ATPase, we expressed the bakers yeast Hsp90 gene (*SchHSP82*) in *E. coli* and purified the 6×HIS tagged protein. The intrinsic ATPase of the purified protein was strongly inhibited by radicicol (positive control,  $IC_{50}=1,5 \mu M$ ). Also ZON and, even stronger, bZOL inhibited in a concentration dependent manner, with  $IC_{50}$  values of 8.6 and 49  $\mu M$  for bZOL and ZON, respectively. We also tested the available ZON-conjugates for inhibitor activity. ZON-4-sulfate is a prominent side product in many *Fusarium* strains (PLASENCIA and MIROCHA 1991) and also a ZON metabolite in *Arabidopsis* (BERTHILLER et al. 2006). ZON-4-O-glucosides and ZOL-4-O-glucosides were produced using genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing the glucosyltransferase *AtUGT73C6* (POPPENBERGER et al. 2006). Also at the highest concentration tested (150  $\mu M$ ) no inhibition of Hsp90 ATPase activity was observed, demonstrating that the formation of the conjugates is a detoxification reaction of plants. This was also supported by the observation that ZON in high concentrations is toxic for yeast strains with deletions of several ABC transporters, and that expression of the glucosyltransferase protects against toxicity *in vivo*.

The finding that ZON and its biosynthetic precursor bZOL (KIM et al. 2005) are Hsp90 inhibitors suggests that ZON could play a role as suppressor of plant defense. Hsp90 is necessary for the stability of many client proteins such as signal transduction components, and has been shown to be essential for disease resistance. The highly pathogen inducible and also ZON inducible cytosolic HSP90.1 gene is specifically required. Several disease resistance gene products were shown to directly interact with Hsp90, e.g. the tomato *I2* resistance gene product (against *F. oxysporum*). Interference with *HSP90* expression (by virus induced gene silencing) or with Hsp90 activity using inhibitors (geldanamycin, radicicol) showed that Hsp90 is required for function of several gene-for-gene resistance interactions (e.g. barley::powdery mildew (*Mla*), tobacco::TMV (*N*), tomato::nematode (*Mi*), wheat::leaf rust (*Lr21*), *Arabidopsis*::*Pseudomonas syringae* resistance (*RPS2*) (for review see SHIRASU 2009). One would therefore expect that zearalenone production is a virulence factor of *Fusarium*. ZON biosynthesis in *F. graminearum* requires the polyketide synthetase genes *PKS4* and *PKS13*. Three different groups have previously reported that loss of ZON production due to gene inactivation does not alter virulence (GAFFOOR et al. 2005, KIM et al. 2005, LYSØE et al. 2006). In the light of our results this needs to be carefully reinvestigated. Microarray data indicate that the ZON biosynthesis cluster is not expressed at the high temperature used during barley head infection, so lack of an effect of gene disruption is not surprising. Many *Fusarium* strains produce ZON in meaningful amounts only under cool conditions or after a cold shock (JIMENEZ et al. 1996). We therefore hypothesize that ZON may have a detectable virulence function under environmental conditions favorable for ZON production in barley (cool weather during grain filling) or in maize (cool nights late in the season). Experiments are ongoing to test this hypothesis. Furthermore, living plants seem to have a high capacity to antagonize ZON by formation of the masked mycotoxin ZON-glucoside (BERTHILLER et al. 2009b). At present it is unknown whether genetic differences in *Fusarium* resistance and ZON accumulation in plants are correlated with this detoxification ability.

## Acknowledgements

Funded by the Austrian Science Fund (SFB F37), the Austrian genome program GEN-AU, and the Christian Doppler Society.

## References

- BERTHILLER F, WERNER U, SULYOK M, KRŠKA R., HAUSER MT, SCHUHMACHER R, 2006: Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Food Addit Contam 23, 1194-1200.
- BERTHILLER F, HAMETNER C, KRENN P, SCHWEIGER W, LUDWIG R, ADAM G, KRŠKA R, SCHUHMACHER R, 2009a: Preparation and characterization of the masked *Fusarium* mycotoxins zearalenone-4O-beta-D-glucopyranoside, alpha-zearalenol-4O-beta-D-glucopyranoside and beta-zearalenol-4O-beta-D-glucopyranoside by MS/MS and 2D-NMR. Food Addit Contam 26, 207-213.

- BERTHILLER F, SCHUHMACHER R, ADAM G, KRŠKA R, 2009b: Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Anal Bioanal Chem* 395, 1243-1252.
- GAFFOOR I, BROWN DW, PLATTNER R, PROCTOR RH, QI W, TRAIL F, 2005: Functional analysis of the polyketide synthase genes in the filamentous fungus *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Eukaryot Cell* 4, 1926-1933.
- JIMENEZ M, MANEZ M, HERNANDEZ E, 1996: Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *Int J Food Microbiol* 29, 417-421.
- KIM YT, LEE YR, JIN J, HAN KH, KIM H, KIM JC, LEE T, YUN SH, LEE YW, 2005: Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Mol Microbiol* 58, 1102-1113.
- KUIPER-GOODMAN T, SCOTT PM, WATANABE H, 1987: Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol* 7, 253-306.
- LYSØE E, KLEMSDAL SS, BONE KR, FRANSEN RJ, JOHANSEN T, THRANE U, GIESE H, 2006: The *PKS4* gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. *Appl Environ Microbiol* 72, 3924-3932.
- MIRINGTON RN, RITCHIE E, SHOPPEE CW, STERNHELL S, TAYLOR WC, 1965: Some metabolites of *Nectria radicularis* Gerlach and Nilsson (syn. *Cylindrocarpon radicularis* Wr.): The structure of radicularis (monorden). *Aust J Chem* 19, 1265-1284.
- PLASENCIA J, MIROCHA CJ, 1991: Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium* spp. *Appl Environ Microbiol* 57, 146-150.
- POPENBERGER B, BERTHILLER F, BACHMANN H, LUCYSHYN D, PETERBAUER C, MITTERBAUER M, SCHUHMACHER R, KRŠKA R, GLÖSSL J, ADAM G, 2006: Heterologous expression of *Arabidopsis* UDP-glucosyltransferases in yeast for the production of zearalenone-4-O-glucoside. *Appl Environ Microbiol* 72, 4404-4410.
- ROWLANDS MG, NEWBATT YM, PRODRIMOU C, PEARL LH, WORKMAN P, AHERNE W, 2004: High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity. *Anal Biochem* 327, 176-183.
- SHIRASU K, 2009: The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annu Rev Plant Biol* 60, 139-164.
- SGOBBA M, RASTELLI G, 2009: Structure-based and in silico design of Hsp90 inhibitors. *Chem Med Chem* 4, 1399-1409.
- WERNER U, 2005: Characterization of the effect of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, BOKU—University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna.

# Einfluss von Keimfähigkeit und Triebkraft auf den Feldaufgang und Ertrag bei Mais

## Influence of Germination and Vigour with regard to Maize Field Emergence and Yield

Benno Voit<sup>1\*</sup>, Robert Schnellhammer<sup>2</sup>, Joachim Eder<sup>1</sup>, Berta Killermann<sup>1</sup>

### Abstract

Maize cropping has steadily increased in the last 40 years. Because maize is a C4 plant, it has greater demands on temperature during germination and field emergence. In a 3-years field trial, different seed qualities have been tested also in the laboratory with respect to germination, vigour, field emergence and yield. Seeds with a high vigour guarantee a high field emergence rate and a high yield, whereas seeds with low vigour show great variations in field emergence and yield.

### Einleitung

Der Maisanbau hat seit den 70er Jahren in Deutschland kontinuierlich zugenommen. Mit der Einführung des Energiepflanzenanbaus hat der Mais eine zusätzliche Steigerung erfahren. Als C<sub>4</sub>-Pflanze stellt Mais höhere Ansprüche an die Temperatur bei der Keimung und beim Auflaufen (VOIT et al. 2009). Die höheren Ansprüche an das Saatgut werden im Rahmen des Anerkennungsverfahrens nicht geprüft. Die Keimfähigkeit wird bei 20 bzw. 25°C im sterilen Quarzsand bzw. auf Papier festgestellt. Eine Triebkraftprüfung ist nicht vorgeschrieben. Nicht in jedem Frühjahr liegen die Bodentemperaturen bei 15°C und darüber, die für einen problemlosen Feldaufgang notwendig sind. In Jahren mit kaltem oder nasskaltem Frühjahr werden besondere Ansprüche an die Saatgutqualität gestellt, d. h. eine hohe Triebkraft ist notwendig (KILLERMANN und VOIT 2007). An die Saatgutprüfstelle Freising werden bei Mais die meisten Beschwerdeproben wegen schlechtem Feldaufgang zur Untersuchung eingesandt. Dies war der Anlass, warum ein 3-jähriger Labor- und Feldversuch mit unterschiedlichen Saatgutqualitäten durchgeführt wurde.

### Material und Methoden

#### *Keimfähigkeit*

Die Keimprüfungen werden nach den Internationalen Vorschriften zur Prüfung von Saatgut (ISTA-Rules 2009) durchgeführt, d.h. in sterilem Quarzsand bei 20°C und Wechsellicht.

#### *Triebkraft*

Das Keimergebnis im standardisierten Laborversuch lässt keine Aussage über den zu erwartenden Feldaufgang zu, weil die Prüfung unter optimalen Temperaturbedingungen durchgeführt wird. Bei Fruchtarten, wie Mais, mit einem hohen Temperaturanspruch ist eine weitere Prüfung im Labor unter Stressbedingungen, die den Feldaufgang beeinflussen, notwendig (KILLERMANN und VOIT 2006). Am besten dafür eignen sich Triebkraftprüfungen (FUCHS 1997). Triebkraftprüfungen sind Keimprüfungen unter erschwerten Bedingungen, d.h. als Keimmedium wird Ackererde verwendet und die Keimtemperatur deutlich abgesenkt. Bei Mais werden die Keimschalen eine Woche einer Stressphase bei 10°C im Klimaschrank ausgesetzt. Im Anschluss werden die Keimschalen in die Klimakammer gebracht und bei 25°C die Keimlinge herangezogen.

#### *Feldaufgang*

Die Versuche wurden auf zwei Standorten angebaut. Ein Standort war Rothalmünster im tertiären Hügelland mit den günstigsten klimatischen Bedingungen in Bayern. Der zweite Standort Freising mit Aueböden und Spätfrostgefahr gilt als klimatisch durchschnittlich. Die Versuche wurden als randomisierte Blockanlage mit 3-facher Wiederholung bei einer Parzellengröße von 10 m<sup>2</sup> angelegt. Die Saatzeit war praxisüblich Ende April/Anfang Mai. Der Feldaufgang wurde von der ganzen Parzelle ermittelt.

#### *Ertrag*

Zur Ertragsermittlung wurde ein sogenannter Kerndrusch durchgeführt, d.h. die beiden Randreihen wurden nicht geerntet, um positive und negative Randeffekte zu vermeiden.

### Ergebnisse und Diskussion

Im ersten Versuchsjahr wurden 3 unterschiedliche Sorten (A, B, C) mit jeweils einer guten und weniger guten Saatgutqualität geprüft. Als Qualitätskriterium wurde die Triebkraft herangezogen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Keimfähigkeit nicht mit den Werten der Triebkraft korreliert

<sup>1</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Vöttinger Straße 38, D-85354 FREISING

<sup>2</sup> Höhere Landbauschule Rothalmünster, Franz-Gerauer-Straße 22-24, D-94094 ROTTHALMÜNSTER

\* Ansprechpartner: Dipl.-Ing. Benno VOIT, benno.voit@lf.lf.bayern.de

**Tabelle 1: Ergebnisse Keimfähigkeit, Triebkraft, Feldaufgang und Ertrag bei drei unterschiedlichen Sorten (A, B, C) und zwei verschiedenen Saatgutqualitäten (gut, schlecht) im 1. Versuchsjahr**

Saatgutpartien Sorte	Keimfähigkeit Qualität	Triebkraft %	Feldaufgang		Ertrag			
			Rotthalmünster relativ	Freising relativ	Rotthalmünster		Freising	
					absolut dt/ha	relativ	absolut dt/ha	relativ
A	gut	98	98	100	122,1	100	130,2	100
A	schlecht	88	40	66	101,3	83	82,5	64
B	gut	95	90	100	114,2	100	103,8	100
B	schlecht	97	80	98	111,4	98	105,6	102
C	gut	97	94	100	104,4	100	93,1	100
C	schlecht	92	62	86	94,7	91	88,8	95

(Tabelle 1). Fast alle Partien liegen in der Keimfähigkeit über 90 %, während die Triebkrafteergebnisse zwischen 40 und 98 % liegen. Damit wird unterstrichen wie wichtig die Triebkraftprüfung im Labor ist, da mit der Keimfähigkeitsprüfung die unterschiedlichen Saatgutqualitäten nicht festgestellt werden können. Beim Feldaufgang zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Saatgutqualitäten. Die Auflaufergebnisse der guten Saatgutqualität wurden dabei jeweils relativ 100 gesetzt, was auch gerechtfertigt ist. Alle guten Saatgutqualitäten wiesen in jedem Versuchsjahr einen hervorragenden Feldaufgang auf. Von den ausgesäten Körnern wich die Zahl der aufgelaufenen Körner nur minimal zwischen 0 und 3 % ab. Der Feldaufgang der schlechten Saatgutqualitäten lag über den Triebkraftwerten. Bei der Sorte A wurden nur 66 bzw. 61 % aufgelaufene Pflanzen im Vergleich zur guten Saatgutqualität ermittelt.

Erwartungsgemäß wirkte sich der schlechtere Feldaufgang auch auf den Ertrag aus. Es waren aber Schwankungen zwischen den Standorten zu beobachten, insbesondere bei

der schlechten Saatgutqualität der Sorte A. So lag auf dem Standort Rotthalmünster der Ertrag bei relativ 83 und auf dem Standort Freising bei nur 64, obwohl sich beim Feldaufgang eine Differenz von nur 5 % zwischen den beiden Standorten zeigte. Das heißt je niedriger die Saatgutqualität ist, umso größer können die Ertragsschwankungen sein. Dies muss aber nicht so sein, wie die Ergebnisse von Sorte B und C zeigen. Sorte C weist mit nur 62 % einen niedrigen Triebkraftwert auf, erreicht aber mit relativ 91 bzw. 95 ein erstaunlich hohes Ertragsniveau.

In jedem Jahr mussten die Versuche mit anderen Sorten durchgeführt werden, da von der gleichen Sorte die unterschiedlichen Saatgutqualitäten nicht zur Verfügung standen.

Die Versuchsjahre 2 und 3 bestätigen die Ergebnisse des 1. Versuchsjahres (Tabelle 2 und 3). Zusätzlich wurde zu jeder Sorte (D, E, F, G, H, I) eine mittlere Saatgutqualität geprüft. Dabei zeigte sich, dass selbst bei der mittleren Saatgutqualität in der Mehrzahl der Fälle Ertragsverluste bis

**Tabelle 2: Ergebnisse Keimfähigkeit, Triebkraft, Feldaufgang und Ertrag bei drei unterschiedlichen Sorten (D, E, F) und drei verschiedenen Saatgutqualitäten (gut, mittel und schlecht) im 2. Versuchsjahr**

Saatgutpartien Sorte	Keimfähigkeit Qualität	Triebkraft %	Feldaufgang		Ertrag			
			Rotthalmünster relativ	Freising relativ	Rotthalmünster		Freising	
					absolut dt/ha	relativ	absolut dt/ha	relativ
D	gut	98	97	100	135,1	100	125,2	100
D	mittel	96	92	97	136,7	101	117,3	94
D	schlecht	91	88	88	127,4	94	123,6	99
E	gut	96	95	100	137,9	100	119,3	100
E	mittel	92	91	95	129,1	94	109,9	92
E	schlecht	91	80	92	129,4	94	112,9	95
F	gut	97	95	100	151,3	100	132,2	100
F	mittel	99	92	99	144,2	95	124,9	95
F	schlecht	99	84	93	151,9	100	123,5	93

**Tabelle 3: Ergebnisse Keimfähigkeit, Triebkraft, Feldaufgang und Ertrag bei drei unterschiedlichen Sorten (G, H, I) und drei verschiedenen Saatgutqualitäten (gut, mittel und schlecht) im 3. Versuchsjahr**

Saatgutpartien Sorte	Keimfähigkeit Qualität	Triebkraft %	Feldaufgang		Ertrag			
			Freising relativ		Rotthalmünster		Freising	
					absolut dt/ha	relativ	absolut dt/ha	relativ
G	gut	95	92	100	125,0	100	146,1	100
G	mittel	96	90	97	122,6	98	143,6	98
G	schlecht	90	78	89	115,7	93	138,4	95
H	gut	96	98	100	141,9	100	154,1	100
H	mittel	93	91	99	133,0	94	163,0	106
H	schlecht	92	85	96	129,8	91	149,7	97
I	gut	93	95	100	132,3	100	164,3	100
I	mittel	93	93	90	135,3	102	151,2	92
I	schlecht	93	78	100	97,2	73	174,2	106



Abbildung 1: Feldaufgang mit guter Saatgutqualität (Triebkraftwert 98 %) der Sorte H im 3. Versuchsjahr (Wuchshöhe 30 cm markiert)

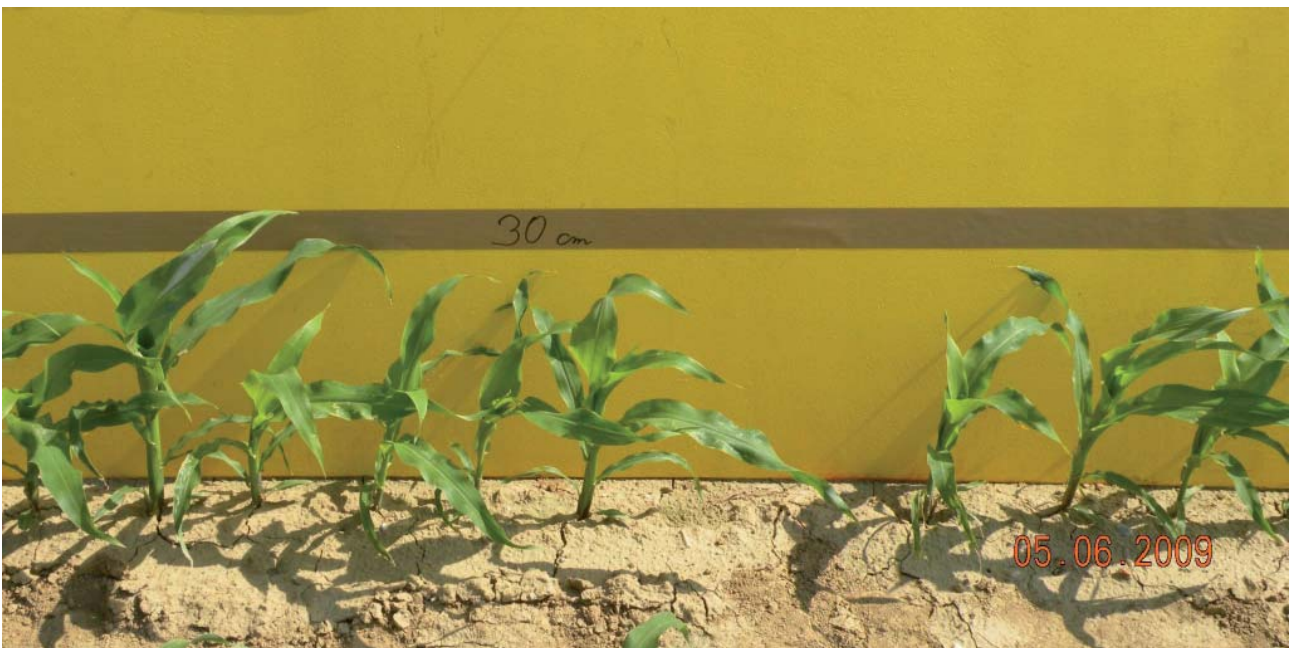


Abbildung 2: Feldaufgang mit schlechter Saatgutqualität (Triebkraftwert 85 %) der Sorte H im 3. Versuchsjahr (Wuchshöhe 30 cm markiert)

zu 8 % gegenüber der guten Saatgutqualität zu verzeichnen waren. Ähnlich verhielt es sich mit dem Feldaufgang. Auch hier wurde ein um bis zu 10 % niedrigerer Feldaufgang gegenüber der guten Saatgutqualität festgestellt. Beobachtet wurde, dass die Anfangsentwicklung bei den guten Saatgutqualitäten schneller und gleichmäßiger war, als bei den weniger guten Qualitäten (Abbildung 1 und 2).

### Zusammenfassung und Ausblick

Es zeigt sich, dass der Feldaufgang und Ertrag umso sicherer sind je höher die Triebkraft ist. Umgekehrt gilt je niedriger

die Triebkraft, umso unsicherer ist der Feldaufgang und umso größer können die Ertragsschwankungen sein.

Mit dem Triebkrafttest können schwache Saatgutpartien hervorragend bestimmt werden. Leider war in den 3 Versuchsjahren kein einziges nasskaltes Frühjahr dabei in dem die Triebkraft der Maiskörner richtig gefordert gewesen wäre. Weitere Faktoren die auf den Feldaufgang Einfluss nehmen sind die Bodenstruktur, Saatbettbereitung und bei Tierhaltung bzw. Biogas die Gülle-Gärresteausbringung. An beiden Standorten waren diese Faktoren in Ordnung. In der Praxis trifft dies nicht immer zu. Wenn die aufgeführten

Beeinträchtigungen zugetroffen hätten, wäre mit Sicherheit der Feldaufgang und der Ertrag bei manch schlechter Saatgutqualität dadurch noch deutlich niedriger gewesen, wie Reklamationen an der Saatgutprüfstelle Freising in der Vergangenheit gezeigt haben.

Unser Dank gilt der Höheren Landbauschule Rothalmünster sowie der Arbeitsgruppe Mais an der LfL für die Durchführung und Betreuung der Feldversuche.

## Literatur

- FUCHS, H., 1997: Der Erd-Kalttest als Triebkraftprüfung; Möglichkeiten und Grenzen seines Einsatzes in der praktischen Saatgutprüfung. VDLUFA Schriftenreihe 46, 87-90.
- ISTA (International Seed Testing Association), 2009: International Rules for Seed Testing (Internationale Vorschriften für die Prüfung von Saatgut). Zürich, Schweiz.
- VOIT, B., WUTZ S., KUNZ, S., ROLLER, A., STICKSEL, E., KILLERMANN, B., 2009: Keimfähigkeit, Triebkraft und Feldaufgang bei Hirse. Tagungsband der 59. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 93-96.
- KILLERMANN, B., VOIT, B., 2006: Keimen in der Kälte. Warum ist die Triebkraftprüfung bei Maissaatgut notwendig? Bayerisches Landwirtschaftliches Wochenblatt, Heft 8, 39.
- KILLERMANN, B., VOIT, B., 2007: Mais: Triebkraft beachten. dlz Agrarmagazin, Heft 12, 32-33.

# Charakterisierung der Wurzeigenschaften von Khorasan- und Durumweizen mittels kapazitiver Feldmessung und Bildanalyse

## Characterizing root properties of Khorasan and durum wheat by capacitance measurement and image analysis

Gernot Bodner<sup>1\*</sup>, Heinrich Grausgruber<sup>1</sup>, Mollabashi Elnaz Ebrahimi<sup>2</sup> und Hans-Peter Kaul<sup>1</sup>

### Abstract

Drought tolerance will become an essential trait for successful crop production facing climate change. This breeding target can be sustained by extending existing germplasm by underutilized species and varieties. The root system is essential for an optimum use of soil water resources for plant growth. Integrating root parameters in breeding for drought tolerance requires their quantitative description. The objective of the study is the characterization of the root system of the tetraploid wheat species *Triticum turanicum* (Khorasan wheat) and *T. durum* using indirect capacitance measurement and image analysis. In both experimental years Khorasan wheat had a superior root capacitance compared to durum wheat being 28% higher in average. After an extremely dry April in 2009, also the image analysis revealed a higher root length and a narrower root-shoot ratio of Khorasan wheat. The capacitance method was found to be a reliable screening tool to differentiate between the species. However, it only provides limited information on the root system properties. Image analysis on the contrary gives a detailed quantitative description of root parameters which potentially contribute to an improved water uptake, while the clear distinction among species is complicated due to the high natural heterogeneity of root systems and the limited possibility of sub-sampling for this method.

### Keywords

Drought tolerance, measurement methods, root system, tetraploid wheat

### Einleitung

Zur Sicherung der Nahrungsmittelproduktion wird in Anbetracht von Klimawandel und Witterungsextremen die Trockenheitstoleranz landwirtschaftlicher Nutzpflanzen zu einem entscheidenden Selektionskriterium. Nach LEVITT (1980) können Pflanzen über zwei Wege Trockenheit vermeiden ('drought avoidance'): durch die Minimierung von Verlusten sowie die Maximierung der Aufnahme. Letzteres wird insbesondere durch ein intensives Wurzelsystem erreicht. WAINES und EHDAIE (2007) zeigten, dass das

Zuchtziel der Ertragssteigerung unter Optimumbedingungen über viele Jahre jedoch zu einer systematischen Züchtung gegen die Wurzel führte. Zur Verbesserung der Trockenheitstoleranz können die genetischen Ressourcen von verwandten Wildpflanzen, wenig genutzten Arten und Landrassen einen interessanten Beitrag leisten (REYNOLDS et al. 2007).

Ziel in den laufenden Untersuchungen ist die Evaluierung der „Wurzelbiodiversität“ von tetraploiden Weizen, um potentielle Kandidaten für die züchterische Verbesserung der Wasseraufnahmefähigkeit zu selektieren. Gezeigt werden erste methodische Ergebnisse im Vergleich von Khorasan- (*Triticum turanicum*) und Durumweizen (*T. durum*) bei Verwendung kapazitiver Feldmessung und bildanalytischer Labormessung zur Quantifizierung der Wurzelsystemeigenschaften.

### Material und Methoden

Die Feldversuche wurden in den Jahren 2008 und 2009 auf der Versuchswirtschaft Groß-Enzersdorf im Trockengebiet Ostösterreichs durchgeführt. Die mittlere Jahresniederschlagssumme am Standort liegt bei 524 mm, die Durchschnittstemperatur bei 9,5°C. Der Bodentyp ist ein Tschernosem aus kalkhaltigem Feinsediment über quartären Schottern. Bei der Bodenart handelt es sich um einen schluffigen Lehm mit einer mittleren Wasserspeicherfähigkeit von etwa 150 mm m<sup>-1</sup>. *Tabelle 1* zeigt die Witterung während der Vegetationszeit in den beiden Versuchsjahren. Hervorzuheben ist die Frühjahrstrockenheit 2009 mit einer niederschlagsfreien Periode zwischen 31. März und 10. Mai.

Untersucht wurden die Sorten QK-77 (Kamut®, *T. turanicum*) und Floradur (*T. durum*). Die Versuche wurden als

**Tabelle 1: Saat- und Erntetermin, Niederschlagssumme, Verdunstungssumme (ET<sub>0</sub>) und Mitteltemperatur in der Vegetationszeit**

**Table 1: Sowing and harvest date, precipitation, reference evapotranspiration (ET<sub>0</sub>) and mean temperature during vegetation periods**

Jahr	Saat	Ernte	Niederschlag (mm)	ET <sub>0</sub> (mm)	Temperatur (°C)
2008	13. März	10. Juli	316,6	252,7	14,4
2009	2. April	27. Juli	232,4	258,2	16,9

<sup>1</sup> Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Universität für Bodenkultur, Gregor-Mendel-Straße 33, A-1180 WIEN

<sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Dept. Agronomy, University of Tabriz, Iran

\* Ansprechpartner: Dr. Gernot BODNER, gernot.bodner@boku.ac.at

Blockanlage mit drei Wiederholungen und einer Parzellengröße von 12 m<sup>2</sup> angelegt. Die Wurzelsystemcharakterisierung im Feld erfolgte mittels kapazitiver Messung (CHLOUPEK 1977) unter Verwendung eines LCR-Meters bei einer Messfrequenz von 1 kHz. Die Messung erfolgte zu Beginn des Schossens im Mai (BBCH 30) und zur Blüte im Juni (BBCH 61) des jeweiligen Versuchsjahres. Zum zweiten Messtermin wurden mittels Bodenbohrer (Innendurchmesser 7 cm) Bohrkern bis 60 cm Bodentiefe entnommen (2310 cm<sup>3</sup>) und in 10 cm Proben unterteilt. Im Labor wurden die Wurzeln vom Boden frei gewaschen und von der toten organischen Substanz getrennt, anschließend gefärbt, gescannt und mit dem Programm WinRhizo 4.0 (Regent Instruments, Quebec) analysiert. Das Verfahren ist im Detail bei HIMMELBAUER et al. (2004) beschrieben. Nach Abschluss der Bildanalyse wurde die Wurzelrockenmasse bestimmt. Neben den Wurzeln wurde auch die oberirdische Trockenmasse gemessen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Prozedur MIXED der Software SAS Vers. 9.1 (SAS Institute, Cary, NC).

## Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 1 zeigt die Wurzelkapazität der beiden Arten zu den zwei Messterminen. Zu berücksichtigen ist, dass die Vergleichbarkeit jeweils nur zu einem Termin möglich ist, da sowohl die Bodenfeuchte als auch die Veränderung des Pflanzengewebes im Laufe der Entwicklung einen starken Einfluss auf die Höhe des elektrischen Messsignals haben. Die Wurzelkapazität war zu allen Terminen bei Khorasan-Weizen höher als bei Durum. Die Unterschiede reichten von 5,4% (Juni 2008) bis 51,7% (Juni 2009). Im zweiten Versuchsjahr mit einer ausgeprägten Frühjahrstrockenheit war die Differenz zwischen den Arten zu beiden Terminen ausgeprägter. Die höhere Wurzelkapazität zu Schossbeginn weist auf eine raschere Ausbildung des Wurzelsystems bei Khorasan hin. Besonders bei Sommerungen ist ein rasches Tiefenwachstum der Wurzeln kritisch, um bei frühen Trockenperioden die angelegten Ertragsorgane ausreichend versorgen zu können. Tabelle 2 gibt den oberirdischen Trockenmasseaufwuchs, das Wurzel-Sproß-Verhältnis sowie ausgewählte Parameter der bildanalytischen Wurzelmessung wieder.

Im Allgemeinen zeigen die Daten, dass die Differenzierung im trockeneren Jahr 2009 deutlicher ist. Dennoch konnten die Unterschiede in den Parametern nicht statistisch abgesichert werden. Neben der messtechnischen Problematik spielt dabei wohl auch die geringe Zahl an Freiheitsgrade für den Faktor Weizenart in der statistischen Analyse eine Rolle. Durum zeigt im Mittel einen höheren oberirdischen Aufwuchs. Die visuelle Beurteilung der Bestände zu Vegetationsbeginn zeigte einen schlechteren Feldaufgang bei

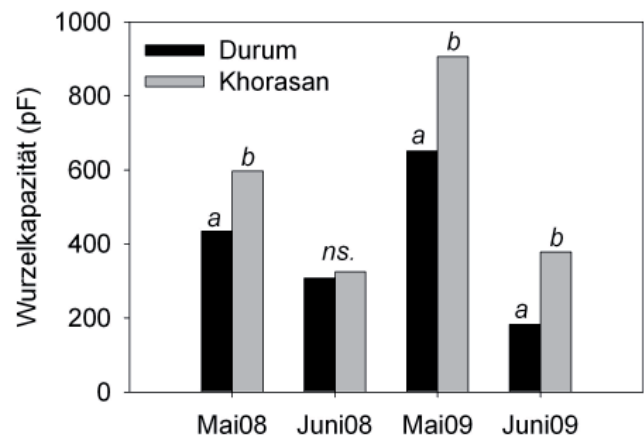


Abbildung 1: Wurzelkapazität zu Schossbeginn und Blüte  
Figure 1: Root capacitance at booting and flowering stage

Khorasan, der wahrscheinlich auf eine geringere Keimfähigkeit des Saatguts zurückzuführen ist. Besonders unter den Trockenbedingungen 2009 konnte dies über die Bestockung nicht ausgeglichen werden. 2008 gab es kaum Unterschiede in der mittleren Wurzellängendichte und der Assimilatverteilung zwischen Wurzel und Spross. 2009 zeigte sich eine Tendenz zu einer intensiveren Wurzelbildung bei Khorasan. In beiden Jahren lag der Anteil feiner Wurzeln (Durchmesser <0.1 mm) bei Durumweizen jedoch höher als bei Khorasan. Wasser- und Nährstoffaufnahme erfolgt vor allem über Feinwurzeln, während dickere Primär- und Sekundärwurzeln in erster Linie dem Transport vom Ort der Aufnahme zum Spross dienen (ZOBEL 2005a,b). Ein höherer Feinwurzelanteil könnte auch bei geringerer Gesamtwurzellänge einen Vorteil für die Wasserversorgung bedeuten. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass besonders in der Quantifizierung der Feinwurzeln noch ungelöste messtechnische Probleme vorliegen (PIERRET et al. 2005).

Methodisch weist die kapazitive Wurzelmessung aufgrund der einfachen Durchführung und der damit hohen Zahl an möglichen Subsamples (10 Pflanzen pro Plot) einen messtechnischen Vorteil auf. Die ausgeprägte Heterogenität in der Ausbildung des Wurzelsystems erfordert Messwiederholungen, um zwischen Arten oder Sorten zu differenzieren. Damit eignet sich die kapazitive Methode besonders für das Feldscreening. Ihr Nachteil liegt in der schwierigen Bewertung des Messsignals, das stark durch die Messumgebung beeinflusst wird und nicht immer eindeutig einer Wurzeigenschaft (Länge, Biomasse) zugeordnet werden kann. Direkte Methoden wie die Bildanalyse erfordern dagegen eine aufwendige Probenvorbereitung und schränken die Möglichkeit der Messwiederholung ein. Sie ermöglichen jedoch eine detaillierte Beschreibung wichtiger wurzelmorphologischer Eigenschaften (Länge, Oberfläche,

Tabelle 2: Biomasse, Wurzel-Sproß Verhältnis und bildanalytische Wurzelparameter

Table 2: Biomass, root-shoot ratio and image analytical root parameters root length density and percentage of fine roots

Spezies	Biomasse (kg ha <sup>-1</sup> )		Wurzel:Spross (%)		Wurzellängendichte (cm cm <sup>-3</sup> )		Feinwurzelanteil (%)	
	2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009
Durum	6617 ns	6054 ns	17,9 ns	20,5 ns	2,44 ns	2,37 ns	29,5 ns	21,7 ns
Khorasan	6592	5761	17,3	23,0	2,44	2,49	19,4	15,9



Durchmesserklassen, Tiefenverteilung). Die bildanalytische Methode kann daher im Kontext der Züchtung nur für gezielte Detailuntersuchungen nach Vorselektion aus dem vorhandenen Material zielführend angewendet werden.

## Schlussfolgerungen

Khorasanweizen weist auf das Potential von züchterisch wenig bearbeiteten Arten hin, über ein intensives Wurzelsystem einen Beitrag zum Ziel einer verbesserten Trockentoleranz zu leisten. Für ein effizientes Screening auf die vorhandene „Biodiversität der Wurzel“ sind rasche Feldmethoden erforderlich. Diese ermöglichen eine Auswahl von Kandidaten für eine nachfolgende detaillierte Wurzelsystemcharakterisierung. Dem Feldversuch vorhergehende Simulationsstudien mit Wurzelarchitekturmodellen könnten künftig eine Eingrenzung der Zielgröße, also jener Wurzelparameter die unter einem gegebenen Trockenregime die Wasseraufnahme optimieren, bringen und damit die Auswahl der effizientesten Messmethode unterstützen.

## Literatur

- CHLOUPEK O, 1977: Evaluation of the size of a plant's root system using its electrical capacitance. *Plant Soil* 48, 525-532.
- HIMMELBAUER ML, LOISKANDL W, KASTANEK F, 2004: Estimating length, average diameter and surface area of roots using two different image analysis systems. *Plant Soil* 260, 111-120.
- LEVITT J, 1980: Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York.
- PIERRET A, MORAN CJ, DOUSSAN C, 2005: Conventional detection methodology is limiting our ability to understand the roles and functions of fine roots. *New Phytol* 166, 967-980.
- REYNOLDS M, DRECCER F, TRETOWAN R, 2007: Drought-adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces. *J Exp Bot* 58, 177-186.
- WAINES JG, EHDAIE B, 2007: Domestication and crop physiology: Roots of green-revolution wheat. *Ann Bot* 100, 991-998.
- ZOBEL RW, 2005a: Primary and secondary root systems. In: Zobel RW, Wright SF (eds.), *Roots and soil management. Interactions between roots and the soil*, 3-14. *Agronomy Monograph* 48, Am Soc Agr, Madison, WI.
- ZOBEL RW, 2005b: Tertiary root systems. In: Zobel RW, Wright SF (eds.), *Roots and soil management. Interactions between roots and the soil*, pp 35-56. *Agronomy Monograph* 48, Am Soc Agr, Madison, WI.

## Weizenzüchtung auf Stein- und Zwergsteinbrandresistenz - markergestützt?

### Wheat breeding for common and dwarf bunt resistance - Marker assisted selection?

Veronika Dumalaso<sup>1\*</sup> und Pavel Bartoš

#### Abstract

Resistance of wheat to common bunt was tested in the Czech Republic in field trials using seeds inoculated with bunt teliospores. Two cultivars, Globus and Bill, displayed a high resistance to common bunt. The average percentage of bunted ears from 2004-2009 was 2.7% for Globus and 7.2% for Bill, whereas it was 59.7% for check cv. Batis. Low common bunt incidence (0-10%) was also recorded in various cultivars of foreign origin, i.e. Bold, Bussard, Cardos, Euris, Magnifik, Mikon, Quebon, Ramiro, Stava, SW51136, Tjelvar, Tommi and Trintella. Of 15 lines with *Bt* genes only *Bt1*, *Bt2*, *Bt3* and *Bt7* were susceptible to Czech common bunt isolates. Globus and Bill displayed also a higher level of resistance to dwarf bunt but it was unsatisfactory in case of a high dwarf bunt contamination of the soil. In such a soil resistance genes *Bt8*, *Bt9*, *Bt10*, *Bt11*, *Bt12* and *Bt13* % were effective (<1% bunted ears).

#### Keywords

Resistance breeding, *Tilletia caries*, *T. controversa*, *T. tritici*, *Triticum aestivum*

#### Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat sich Steinbrand sowie Zwergsteinbrand im Zusammenhang mit beschränkter Saatgutbeizung in mehreren Staaten verbreitet. Neben einer Beizung kann Steinbrand sowie Zwergsteinbrand auch durch Resistenzzüchtung bekämpft werden, wie Beispiele aus mehreren Ländern zeigen. In Kanada und den USA hat die Resistenzzüchtung und der Anbau resistenter Weizensorten die durch Stein- und Zwergsteinbrand verursachten Schaden fast beseitigt. In Schweden wurden zum Beispiel die Sorten Tjelvar und Stava gezüchtet, die in Untersuchungen mehrerer europäischer Staaten eine hohe Steinbrandresistenz aufgewiesen haben.

#### Material und Methoden

Für die Resistenzprüfung wurde Saatgut mit Steinbrandsporen inokuliert. Das Inokulum stammte von mehreren Orten in der Tschechischen Republik und enthielt beide Steinbrandarten *Tilletia tritici* (Bjerk.) Wint. und *T. laevis* Kühn.

Die Samen wurden mit den Sporen (0.1g Sporen für 250 Samen) eine Minute geschüttelt. Die Feldversuche hatten 4 Wiederholungen (1 m lange Reihen, 0.2 m Abstand zwischen den Reihen). Das Saatgut der tschechischen Sorten stammte aus dem Zentralinstitut für Kontrolle und Prüfung in der Landwirtschaft, das Saatgut der ausländischen Sorten aus der Genbank des Forschungsinstitutes für Pflanzenproduktion, Praha-Ruzyně. Die Virulenz der Steinbrand- sowie Zwergsteinbrandpopulation wurde mit Hilfe eines Differentialsortiments von 13 Linien mit den einzelnen, unterschiedlichen *Bt* Genen ermittelt. Für den Steinbrandtest wurde das Saatgut inokuliert, für den Zwergsteinbrandtest wurde der Boden mit Sporen verseucht.

#### Ergebnisse und Diskussion

##### Steinbrandresistenz

Obwohl die meisten der in der Tschechischen Republik registrierten Weizensorten anfällig gegenüber Steinbrand sind (DUMALASOVÁ und BARTOŠ 2006, 2007, 2009), gibt es zwei Sorten, Globus und Bill, die eine relativ hohe Resistenz zeigen (Tabelle 1). Globus wurde von der Firma Nordsaat Saatzucht GmbH gezüchtet und stammt aus der Kreuzung Ralf/Astron//Haven. Dieselbe Herkunft hat angeblich auch die Sorte Tommi, die in Deutschland als resistent gegenüber Steinbrand gilt. Die Sorte Quebon von derselben Firma zeigt ebenfalls eine hohe Steinbrandresistenz. Bei der dänischen Sorte Bill handelt es sich um eine Dihaploide eines Multicross.

Mehrere ausländische Sorten hatten in unseren Versuchen eine relativ hohe Steinbrandresistenz gezeigt. Einen Befall von 0-10% brandiger Ähren zeigten die Sorten Bold, Bussard, Cardos, Euris, Magnifik, Mikon, Quebon, Ramiro, SW

Tabelle 1: Steinbrandbefall ausgewählter Weizensorten in den Jahren 2004 bis 2009

Table 1: Common bunt infection (% bunted ears) of selected wheat cultivars in 2004-2009

Sorte	Jahr - Befallene Ähren (%)					
	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Globus	0.9	0.0	0.9	5.6	4.6	2.4
Bill	10.4	0.1	8.0	10.6	6.0	7.0
Batis	83.9	56.9	54.7	59.1	37.2	58.4

<sup>1</sup> Crop Research Institute, Drnovská 507, CZ-16106, PRAHA

\* Ansprechpartner: Veronika DUMALASOVÁ, dumalaso@yurv.cz

51136, Tjelvar, Tommi und Trintella. Einen Befall von 10-20% die Sorten Brutus, Lars, Maltop und Tarso. Die meisten dieser Sorten haben auch in deutschen Versuchen eine hohe Steinbrandresistenz gezeigt (WÄCHTER et al. 2007). In der Tschechischen Republik wurde eine Virulenz hinsichtlich der Gene *Bt1*, *Bt2*, *Bt3* und *Bt7* gefunden, in Deutschland zu denselben Genen, sowie weiters zu den Genen *Bt9*, *Bt13* und *Bt15* (KOCH und SPIESS 2006).

### Zwergsteinbrandresistenz

Unter den in der Tschechischen Republik registrierten Weizensorten gibt es keine Sorte die gegenüber Zwergsteinbrand resistent ist. Der Zwergsteinbrandbefall der gegenüber Steinbrandbefall resistenten Sorten Globus und Bill sind in *Tabelle 2* zusammengefasst. Die gute Resistenz der Sorte Bill wurde von VÁNOVÁ et al. (2006) beschrieben.

Obwohl Globus und Bill eine höhere Resistenz als die anfällige Kontrolle gezeigt haben, ist diese Resistenz auf mit Zwergsteinbrand verseuchten Böden ungenügend. In Deutschland waren Sorten die Steinbrandresistenz zeigten auch mit Zwergsteinbrand weniger befallen (Stava, Magnifik, SW51136, Tommi). Im Vergleich zur anfälligen Sorte Jubilar waren auch Ataro, Toronto, Tommi, Pegassos und Tarso statistisch signifikant weniger befallen (WÄCHTER et al. 2007).

Wir haben die Effektivität der Linien mit unterschiedlichen *Bt* Genen im künstlich verseuchten Boden untersucht. Die Kontrolllinie mit *Bt7* hatte 4.9% befallene Ähren. Den niedrigsten Befall hatten die Linien *Bt11*, *Bt12*, *Bt13* (ohne Befall), *Bt9* (0.1%), *Bt8* (0.3%) und *Bt10* (0.7%). Einige dieser Resistenzgene wurden in nordamerikanischen Zuchtprogrammen angewandt. Die resistente Sorte Blizzard enthält *Bt12*, Bonneville *Bt12+*, Golden Spike *Bt12+*, Deloris und Gary *Bt3*, *Bt9* und *Bt10*, Winnridge *Bt8*, *Bt9* und *Bt10* (GOATES, pers. Mitt.). In Österreich haben HUBER und BÜRSTMAYR (2006) die Zwergsteinbrandresistenz der Sorten Bonneville und Golden Spike bestätigt und weiters die Resistenz der Sorten Weston (*Bt8*, *Bt9*, *Bt10*) und Sprague beschrieben.

### Lokalisierung der *Bt* Gene

Nur einige von den beschriebenen *Bt* Genen wurden bisher auf Chromosomen lokalisiert. Es ist interessant, dass auf Chromosom 1B mehrere *Bt* Gene lokalisiert wurden. *Bt4* ist

**Tabelle 2: Zwergsteinbrandbefall der Sorten Globus und Bill in Relation zu einer anfälligen Kontrollsorte (Feldbeobachtungen in Mittelböhmen)**

**Table 2: Dwarf bunt infection of Globus and Bill in relation to a susceptible check cultivar (% bunted ears m<sup>-2</sup>; field observations in Central Bohemia)**

Jahr	Sorte		
	Globus	Bill	Anfällige Kontrolle
2006	58%	-	Batis 3.4 befallene Ähren/m <sup>2</sup> = 100%
2006	36%	-	Batis 0.2 befallene Ähren/m <sup>2</sup> = 100%
2007	11%	92%	Ilias 0.85 befallene Ähren/m <sup>2</sup> = 100%
2008	37%	43%	Heines VII 3.0 befallene Ähren/m <sup>2</sup> = 100%

mit *Bt5* bei einer Rekombinationsrate von 30% und mit *Bt6* bei 15.2% gekoppelt (siehe Referenzen bei MCINTOSH et al. 1998). Auf 1B haben auch FOFANA et al. (2008) die Steinbrandresistenz der Sommerweizensorte AC Domain lokalisiert, sowie WANG et al. (2009) die Resistenz der Sorte Blizzard. Für Blizzard wurde das Gen *Bt12* beschrieben. Aufgrund unserer Feldversuchen mit dihaploiden Linien der Kreuzung Trintella (steinbrandresistent) x Piko (steinbrandanfällig), die am John Innes Center, Norwich, entwickelt wurde, hat Dr. J. Snape die Resistenz der Sorte Trintella auch auf dem Chromosom 1B lokalisiert. Dieses Gen scheint allerdings nicht mit den Genen die von FOFANA et al. (2008) und WANG et al. (2009) beschrieben wurden identisch zu sein. Die Beziehung zu *Bt4*, *Bt5* und *Bt6* wurde noch nicht untersucht. *Bt7* wurde auf Chromosom 2D (MCINTOSH et al. 1998), das Gen *Bt10* auf Chromosom 6D lokalisiert (MENZIES et al. 2006).

### Molekulare Marker für *Bt* Gene

Mehrere molekulare Marker für *Bt* Gene wurden beschrieben, z.B. für *Bt8* und *Bt11* von CIUCA et al. (2007), für *Bt10* von DEMEKE et al. (1996) und LAROCHE et al. (2000), sowie für *Bt12* von WANG et al. (2009). Eine umfangreiche Verifizierung der molekularen Marker für *Bt8*, *Bt10*, *Bt11* und *Bt12* wurde von CICHY und GOATES (2009) durchgeführt. Insgesamt wurden 74 Weizensorten bzw. Linien auf die Anwesenheit von *Bt8*, *Bt10*, *Bt11* und *Bt12* geprüft. Die Übereinstimmung der genetischen Angaben über die Anwesenheit der *Bt* Gene in insgesamt 33 Genotypen und der Markeranalyse wird in *Tabelle 3* dargestellt. Auch Linien ohne *Bt* Gene wurden untersucht und in einigen wurde eine positive Reaktion mit den molekularen Markern festgestellt.

**Tabelle 3: Verifizierung der molekularen Marker (CICHY und GOATES 2009)**

**Table 3: Validation of molecular markers for *Bt* genes (CICHY and GOATES 2009). Number of tested genotypes with respective resistance genes and number of genotypes in which the *Bt* gene was identified by the respective molecular marker**

Resistenzgen (n, Anzahl geprüfter Genotypen)	Anzahl Genotypen in denen durch Marker das entsprechende <i>Bt</i> Gen identifiziert wurde		
<i>Bt12</i> (n=16)	<i>Xgwm 374</i>	<i>Wgwm 264</i>	<i>Xbarc 128</i>
	4	11	12
<i>Bt10</i> (n=10)	<i>RAPD 196</i>	<i>RAPD 372</i>	
	7	5	
<i>Bt8</i> (n=6)	<i>RAPD psg 3</i>		
	4		
<i>Bt11</i> (n=1)	<i>Xgwm 114</i>		
	1		

## Schlussfolgerungen

Mehrere europäische Weizensorten zeigen eine relativ hohe Steinbrandresistenz, aber niedrige Zwergsteinbrandresistenz. Nordamerikanische Weizensorten mit dem Resistenzgen *Bt12* und anderen, die gegen Steinbrand sowie Zwergsteinbrand resistent sind, können als Resistenzquellen in der Züchtung dienen. Für eine markergestützte Resistenzzüchtung sind noch weitere Arbeiten zur Identifizierung von mit Resistenzgenen eng gekoppelten Marker notwendig.

## Danksagung

Die durchgeführten Arbeiten sind Teil der Forschungsprojekte MZE 0002700602 und 1G58083.

## Literatur

- CICHY K, GOATES BJ, 2009: Evaluation of molecular markers for common bunt resistance genes in diverse wheat genotypes. ASA-CSSA-SSSA International Annual Meetings, 1-5 Nov, Pittsburgh, Abstracts [Available online: <http://a-c-s.confex.com/crops/2009am/webprogram/Paper54548.html>; accessed 11 Dec 2009].
- CIUCA M, ITTU M, ONCICA F, TEZEL-MATEESCU R, CORNEA C, IUORAS M, 2007: Research concerning the use of molecular techniques based on PCR in wheat breeding for common bunt resistance (*Tilletia* sp.). *Probl Genet Theor Aplic* 39, 1-18.
- DEMEKE T, LAROCHE A, GAUDET DA, 1996: A DNA marker for the *Bt10* common bunt resistance gene in wheat. *Genome* 39, 51-55.
- DUMALASOVÁ V, BARTOŠ P, 2006: Resistance of winter wheat cultivars to common bunt, *Tilletia tritici* (Bjerk.) Wint. and *T. laevis* Kühn. *J Plant Dis Protect* 113, 9-13.
- DUMALASOVÁ V, BARTOŠ P, 2007: Reaction of winter wheat cultivars to common bunt *Tilletia tritici* (Bjerk.) Wint. and *T. laevis* Kühn. *Plant Protect Sci* 43, 138-141.
- DUMALASOVÁ V, BARTOŠ P, 2009: Reaction of wheat and triticale cultivars to common bunt. *Czech J Genet Plant Breed*, in press.
- FOFANA B, HUMPHREYS DG, MCCARTNEY CA, SOMERS DJ, 2008: Mapping quantitative trait loci controlling common bunt resistance in a doubled haploid population derived from the spring wheat cross RL4452 x AC Domain. *Mol Breed* 21, 317-325.
- HUBER K, BUERSTMAYR H, 2006: Development of methods for bunt resistance breeding for organic farming. Proc 15<sup>th</sup> Biennial Workshop on the Smut Fungi, 11-14 Jun, Prague. *Czech J Genet Plant Breed* 42, Special Issue, 66-71.
- KOCHE, SPIEB H, 2006: Resistenz von Winterweizensorten und -zuchtlinien gegenüber Steinbrand (*Tilletia tritici*) und Zwergsteinbrand (*T. controversa*). 55. Deutsche Pflanzenschutztagung Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft. 400: 295.
- LAROCHE A, DEMEKE T, GAUDET DA, PUCHALSKI B, FRICK M, MCKENZIE R, 2000: Development of a PCR marker for rapid identification of the *Bt10* gene for common bunt resistance in wheat. *Genome* 43, 217-223.
- MCINTOSH RA, HART GE, DEVOS KM, GALE MD, ROGERS WJ, 1998: Catalogue of gene symbols for wheat. In: Slinkard AE (ed.), Proc 9<sup>th</sup> Int Wheat Genet Symp, 2-7 Aug, Saskatoon, Vol 5, 1-229. University Extension Press, Univ Saskatchewan, Saskatoon.
- MENZIES JG, KNOX RE, POPOVIC Z, PROCUNIER JD, 2006: Common bunt resistance gene *Bt10* located on wheat chromosome 6D. *Can J Plant Sci* 86, 1409-1412.
- VÁŇOVÁ M, MATUŠINSKÝ P, BENADA J, 2006: Survey of incidence of bunts (*Tilletia caries* and *Tilletia controversa*) in Czech Republic and susceptibility of winter wheat cultivars. *Plant Protect Sci* 42, 21-25.
- WÄCHTER R, WALDOW F, MÜLLER KJ, SPIESS H, HEYDEN B, FURTH U, FRAHM J, WENG W, MIEDANER T, STEPHAN D, KOCH E, 2007: Charakterisierung der Resistenz von Winterweizensorten und zuchtlinien gegenüber Steinbrand (*Tilletia tritici*) und Zwergsteinbrand (*T. controversa*). *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutzd* 59, 30-39.
- WANG S, KNOX RE, DEPAUW R, CLARKE FR, CLARKE JM, THOMAS JB, 2009: Markers to common bunt resistance gene derived from 'Blizzard' wheat (*Triticum aestivum* L.) and mapped to chromosome arm 1BS. *Theor Appl Genet* 119, 541-553.

## Molecular mapping of resistance to Fusarium head blight derived from three *Triticum* species

Maria Buerstmayr, Karin Huber, Abdallah Alimari, Johannes Heckmann,  
Marc Lemmens, Barbara Steiner and Hermann Buerstmayr<sup>1\*</sup>

### 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, and from tetraploid wheats so far. In this contribution we report about genetic analysis of FHB resistance derived from three *Triticum* sources:

- 1) *Triticum macha* (Georgian spelt wheat),
- 2) *Triticum dicoccum* (cultivated emmer) and
- 3) *Triticum dicoccoides* (wild emmer).

Back-cross derived recombinant inbred line populations were developed from crosses of the resistance donors with adapted cultivars. The populations were evaluated for Fusarium response in well replicated experiments with artificial inoculation. The same lines were genetically analysed using SSR and AFLP markers. Map

construction based in the backcross derived RIL populations was done with Carthagene and QTL mapping in QGene. Several novel QTL were identified. In *T. macha* five new QTL were found on four chromosomes (2A, 2B, 5A, 5B), the largest effect QTL overlapped with the *Q* locus (spelt type) on 5A. In *T. dicoccum* the largest QTL mapped to chromosome 4B (overlapping with *RhtB1*). In wild emmer (*T. dicoccoides*) significant QTL were detected on chromosomes 3A and 6B.

### Keywords

Emmer, genetic resources, QTL, resistance, spelt, wheat

### Acknowledgments

We acknowledge funding of this work by FWF (Austrian Science Fund), project number 17310-B05

<sup>1</sup> BOKU, University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Department IFA-Tulln, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

\* Ansprechpartner: Dr. Hermann BUERSTMAYR, hermann.buerstmayr@boku.ac.at

# Resistenzquellen gegenüber Ährenfusariosen und ihre Nutzung in der Weizenzüchtung

## Resistance sources against Fusarium head blight and their use in wheat breeding

Jana Chrpová<sup>1\*</sup>, Václav Šíp<sup>1</sup>, Lenka Štočková<sup>1</sup>, Pavel Horčíčka<sup>2</sup>,  
Ondřej Veškrna<sup>2</sup>, Tereza Kašová<sup>2</sup> und Tibor Sedláček<sup>2</sup>

### Abstract

Resistance to Fusarium head blight (FHB) was evaluated at three locations in selected resistance sources and breeding lines after inoculation with *Fusarium culmorum*. The lowest deoxynivalenol (DON) content was detected in materials derived from Sumai 3, but their agronomic value was low compared to other tested material. The possibility of exploitation of marker-assisted selection (MAS) in breeding for resistance to FHB was studied in two spring wheat crosses with highly resistant Sumai 3. It was found that the choice of genotypes carrying the combination of donor 3B and 5A QTL had significant effect on reducing FHB severity and resulted in a relatively higher frequency of genotypes showing less than 20% infestation of the spikelets. However, it was shown that the presence of these QTL does not exclude the occurrence of susceptible genotypes. Combining MAS and phenotypic selection is, therefore, highly desirable. A lower infestation was in both crosses connected with the presence of awned Sumai 3 types.

### Keywords

Molecular marker, mycotoxin, *Triticum aestivum*

### Einleitung

Fusariumpilze zählen weltweit zu den gefährlichsten Getreidekrankheiten. Ährenfusariosen reduzieren die Kornzahl pro Ähre, das Tausendkorngewicht und die Triebkraft des Saatgutes. Ertragsverluste von bis zu 50% können die Folge sein. Noch wichtiger ist die Fähigkeit der Fusarien, Mykotoxine zu bilden, pilzliche Stoffwechselprodukte, die schon in geringen Mengen toxisch wirken und bei Mensch und Tier schwere Schädigungen des Organismus verursachen können. Die bisherigen Studien zeigten, dass überwiegend das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) gebildet wird, welches zu den Trichothecen-Derivaten gehört (NICHOLSON et al. 2007). Der Anbau von genetisch resistenten Sorten stellt bisher die effektivste Maßnahme zur Bekämpfung von Ährenfusariosen dar. Monogene vollständige Resistenzen sind nicht bekannt, sondern es wurden polygene vererbte

quantitative Unterschiede in der Resistenz identifiziert (BUERSTMAYR et al. 2008). Die Selektion auf Resistenz kann entweder direkt erfolgen (phänotypische Selektion) oder indirekt (in vitro Selektion, markergestützte Selektion) (BÜRSTMAYR et al. 2000). Ziel dieses Beitrags ist es über die Bewertung der Resistenz gegen Ährenfusariosen bei künstlicher Infektion unter Freilandbedingungen und unter Verwendung von molekularen Markern zu informieren.

### Material und Methoden

#### *Die Bewertung der Ährenfusariosenresistenz bei Resistenzquellen*

Die Resistenz von aus dem European Fusarium Ring Test stammenden Material, sowie von tschechischen Zuchstämmen wurde im Jahr 2008 in Feldversuchen auf 3 Standorten bewertet. Die Versuche wurden künstlich inokuliert durch eine Konidien suspension des *Fusarium culmorum* Isolats (B) (CHRPOVÁ et al. 2007). Zur Unterstützung der Infektion wurde das Versuchsfeld bewässert. Der Ährenbefall wurde als Prozentsatz infizierter Ähren zu 3 Boniturterminen festgestellt. Der DON Gehalt von 10 Ähren wurde mit ELISA bestimmt.

#### *Markergestützte Selektion*

2 Populationen (473 Linien aus Sumai 3 × SG-S191-01; 436 Linien aus Swedjet × Sumai 3) wurden bei Selton bearbeitet. Die Pflanzen wurden in der F<sub>2</sub> zufällig ausgewählt. Die Identifikation der genomischen Regionen QTL 3B und 5A wurde in der F<sub>3</sub> mit der Hilfe der Mikrosatelliten Xgwm493 und Xbarc117 durchgeführt. Das Resistenzniveau der Populationslinien wurde in Feldversuchen nach Sprühinokulation mit *F. culmorum* bewertet (Bonitur 21 Tage nach Inokulation).

### Ergebnisse

Das höchste Resistenzniveau wurde bei den Linien aus dem European Fusarium Ring Test (EFR) festgestellt (*Tabelle 1*). Manche dieser Linien (A 17-15-1-2, 20817-3, Fg 437 und 98710 A) entstanden aus Kreuzungen mit Sumai 3. Tsche-

<sup>1</sup> Forschungsinstitut für Pflanzenproduktion, Drnovská 507, CZ-161 06, PRAHA - RUZYŇE

<sup>2</sup> Forschungszentrum Dipl.-Ing. SELTON, GmbH, Stupice 24, CZ-250 84 SIBŘINA

\* Ansprechpartner: Dipl.-Ing. Jana CHRPOVÁ, chrpova@vurv.cz

**Tabelle 1: DON Gehalt (mg kg<sup>-1</sup>) von ausgewählten Weizen Genotypen von Feldversuchen auf drei tschechischen Standorten im Vergleich zum Sortimentsmittelwert berechnet aus 45 getesteten Genotypen**

**Table 1: DON content (mg kg<sup>-1</sup>) in selected wheat genotypes obtained from field infection trials at three Czech locations in 2008 compared to the average DON content of all 45 tested genotypes**

Genotyp	Pedigree	Origin	Stupice	Ruzyně	Úhřetice	Mean
SG-S257-06	Šárka/Flair//Corsaire	CZ	20,6	49,2	8,5	26,1
SG-U3007 B	Transit/UH 442	CZ	37,3	48,8	11,8	32,6
BR 06/076	Mobil/Nela	CZ	28,3	22,7	9,9	20,3
HE 8096	Meritto/Clever	CZ	15,8	37,5	10,6	21,3
F01302GP3-1	508U3-2FZ2/F135U3-1	RO	2,9	23,3	7,3	11,1
A 17-15-1-2	Capo/3/Sumai 3/81.60//Kincso	A	1,3	19,2	6,0	8,8
20817-3	Capo/Sumai 3	A	5,5	23,4	9,2	12,7
Fg 437	Sumai 3/81.60//Kincso	HU	1,9	9,9	5,7	5,8
98710 A	Atlantis//Tambor/Z14/3/CM82036	D	8,6	11,1	2,8	7,5
Petrus	Nimbus/Vuka//Falke/4/Benno/Caribo//Kornmoran/3/Kronjuwel	D	15,8	42,2	14,2	24,1
Complet	Boxer//M. Huntsman/Monopol	D	69,5	129,9	21,4	73,6
Mean 45 Genotypes			25,6	73,9	15,5	38,3

**Tabelle 2: Ährenfusariosebefall (%) für 2 QTLs (3BS, 5A) bei den Populationen Sumai 3×SG-S 191-01 und Swedjet×Sumai 3 nach Sprühhinokulation mit *F. culmorum*. (Mittelwerte mit denselben Buchstaben sind nicht statistisch voneinander verschieden entsprechend der Grenzdifferenz bei P=0,05)**

**Table 2: Effects of different QTLs on FHB scoring (%) in F<sub>4</sub> populations of two crosses following artificial inoculation with *F. culmorum*. (Means with the same letter are not significant different at P=0.05 according to the LSD test)**

Sumai 3×SG-S 191-01		Swedjet×Sumai 3	
QTL	FHB	QTL	FHB
3BS+5A	26,2 a	3BS+5A	25,6 a
3BS	39,7 b	3BS	41,6 b
5A	42,1 b	5A	44,9 b
No QTL	39,3 b	No QTL	54,0 c

chische Zuchtstämme entstanden überwiegend aus Kreuzungen mit kommerziell genutzten Winterweizensorten. Diese Linien wiesen mittleres bis mäßiges Resistenzniveau aus. Sie haben aber gute agronomische Parameter. Bei Nutzung der MAS wurde festgestellt, dass die Kombination von QTL 3B und 5A zu einer Erhöhung des Resistenzniveaus führt (Tabelle 2). Die Anwesenheit von QTL 3BS kann allerdings anfällige Genotypen nicht gänzlich eliminieren (Tabelle 3). In unseren Versuchen wiesen Nachkommen der Kreuzungen mit Sumai 3 einen signifikanten Einfluss der Begrannung auf. Begrannete Linien zeigten ein signifikant höheres Resistenzniveau (Tabelle 4).

## Zusammenfassung

In Infektionstests auf dem Feld wurde die Resistenz ausgewählter Genotypen gegen Ährenfusariosen bewertet. Die höchsten Resistenzen wurden in Genotypen die von der

Sorte Sumai 3 abstammen festgestellt. Dieses Material weist bisher jedoch ein niedriges agronomisches Niveau auf. Davon zeugt auch die Tatsache, dass in Europa bislang keine kommerzielle Sorte existiert, die Sumai 3 im Stammbaum hat. Weiters wurde die Möglichkeit einer markergestützten Selektion bei Verwendung von Sumai 3 als Resistenzdonor geprüft. Es wurde festgestellt, dass bei Auffinden der QTLs auf 3B und 5A der Anteil an Genotypen mit einem höheren Resistenzgrad wächst. Die alleinige Präsenz des QTL auf 3BS eliminiert jedoch nicht vollständig das mögliche Auftreten anfälliger Linien und gleichzeitig können auch Linien ohne den QTL auf 3BS einen höheren Resistenzgrad aufweisen. Sollte im Rahmen einer MAS nur der QTL auf 3B verwendet werden, so würden perspektivreiche Linien verlorengehen. Als am besten geeignet erscheint die Kombination von MAS und Selektion resistenter Phänotypen in Feldversuchen. Bei den zwei geprüften Kreuzungspopulationen wurde weiters festgestellt, dass die begranneten Linien einen statistisch signifikant niedrigeren Prozentsatz im Ährenbefall aufweisen.

**Tabelle 4: Durchschnittlicher Ährenfusariosebefall von unbegranneten und begranneten Nachkommen der beiden Kreuzungspopulationen (Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind statistisch voneinander signifikant entsprechend der Grenzdifferenz bei P=0,05)**

**Table 4: Average FHB rating of awned and awnless progeny lines of the two crossing populations (Letters after means refer to the LSD test at P=0.05)**

Ear type	Sumai 3×SG-S 191-01		Swedjet×Sumai 3	
	Linien (n)	FHB (%)	Linien (n)	FHB (%)
awnless	213	48,50 b	221	47,24 b
awned	260	27,74 a	215	40,00 a

**Tabelle 3: Häufigkeit von Genotypen mit unterschiedlichen Resistenz QTLs in unterschiedlichen Fusariumbefallsklassen**

**Table 3: Frequency of genotypes with different resistance QTLs in different FHB rating classes**

FHB (%)	Sumai 3×SG-S 191-01			Sumai 3×Swedjet		
	3BS	3BS+5A	Population	3BS	3BS+5A	Population
0-20	46	54	34	43	59	26
21-60	39	38	46	40	28	46
61-60	15	8	20	17	13	28

## Danksagung

Die durchgeführten Arbeiten sind Teil der Forschungsprojekte MZE 0002700604 und NAZV QH81293, die von dem Landwirtschaftsministerium der Tschechischen Republik unterstützt wurden. Dank gilt auch Dr. M. Ittu, Dr. A. Mesterházy, Dr. H. Bürstmayr und Dr. L. Hartl für die Bereitstellung der geprüften Linien.

## Literatur

- BUERSTMAYR H, BAN T, ANDERSON JA, 2008: QTL mapping and marker assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat - a review. *Plant Breeding* 128, 1-26.
- BUERSTMAYR H, LEMMENS M, DOLDI ML, STIERSCHNEIDER M, STEINER B, WERNER K, HARTL L, RUCKENBAUER P, 2000: Resistenzzüchtung bei Weizen gegenüber Ährenfusariosen. Bericht über die 50. Arbeitstagung 1999 der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter, 63-68, BAL Gumpenstein, Irdning.
- CHRPOVÁ J, ŠÍP V, MATĚJOVÁ E, SÝKOROVÁ N, 2007: Resistance of winter wheat varieties registered in the Czech Republic to mycotoxin accumulation in grain following inoculation with *Fusarium culmorum*. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 43, 44-52.
- NICHOLSON P, GOSMAN N, DRAEGER R, THOMSETT M, CHANDLER E, STEED A, 2007: The Fusarium head blight pathosystem. In: Buck HT, Nisi JE, Salomón N (eds) *Wheat Production in stressed Environments, Developments in Plant Breeding* 12, Springer, Dordrecht, 23-36.



## Use of marker-assisted selection (MAS) for pyramiding leaf rust resistance genes (*Lr9*, *Lr24*, *Lr22a*) in wheat

Odile Moullet<sup>1</sup>, Dario Fossati<sup>1\*</sup>, Fabio Mascher<sup>1</sup>, Roberto Guadagnolo<sup>2</sup> and Arnold Schori<sup>1</sup>

### Abstract

Two leaf rust resistance genes, *Lr9* and *Lr24*, have been pyramided through the use of simple sequence repeats (SSR) markers. The obtained wheat lines which carry the two resistance genes are indeed resistant to the leaf rust races currently present in Switzerland and have very good baking quality. However, the lines can only be considered as a first step, since it was difficult to reach acceptable uniformity. Furthermore, sufficient yield for commercial success could not be achieved. However, the lines have been used as parents to cumulate other resistance genes (*Lr22a*). This first cycle of 'pyramidation' allowed us to evaluate the costs for marker-assisted selection (MAS). MAS proved to be an efficient tool in a breeding program. It is yet necessary to integrate this benefit into the global context of yield, resistance and quality required for the release of commercially successful wheat varieties.

### Key words

leaf rust, MAS, molecular markers, PCR, resistance breeding, SSR, wheat

### Introduction

Leaf rust is an important foliar disease of wheat. Growing resistant cultivars is probably the most efficient, cost-effective and environment-friendly method to control this disease (SINGH et al. 2004). More than 70 specific leaf rust resistance genes are known (KOMUGI 2009). Many of them have been introgressed into wheat from wild relatives as *Lr9* from *Aegilops umbellulata*, *Lr24* from *Agropyron elongatum* or *Lr22a* from *Aegilops tauschii*. However the ability of the pathogen to adapt to new resistances by single step mutation constitutes a never-ending challenge for breeders. Frequently, the pyramiding strategy, combining several resistance genes into one cultivar, has been proposed to enhance the durability of resistances (PEDERSEN and LEATH 1988). Combining two or more resistance genes using classical host-parasite infection methods is highly time-consuming and needs specific virulent pathotypes that are often not available or too risky to use. Molecular biology and marker-assisted selection (MAS) offers the possibility to trace resistance genes in cultivars in an easier and more efficient way. At least 33 molecular markers

linked to *Lr* resistance genes have been described at present (KOMUGI 2009). When the project started, no virulence was found for *Lr9* or *Lr24* in the leaf rust populations in Switzerland and, worldwide, no virulence was reported for the combination *Lr9* and *Lr24* (SCHACHERMAYR et al. 1995). Molecular markers and plant material for these genes were also available. Similar studies have been done by other groups in Europe (VIDA et al. 2005, NOCENTE et al. 2007) but only little information is available on the lines and their commercial outcome. In this study we evaluate the pyramiding of two leaf rust resistance genes by MAS in a small breeding program.

### Materials and methods

#### Plant material

The *Lr9* and the *Lr24* resistance gene donors (Transfer/6\* Thatcher and Agent/6\*Thatcher) were backcrossed seven times to susceptible Swiss winter wheat cultivar Arina and selfed to produce the F<sub>8</sub> generation. NILs (near isogenic lines) containing *Lr9* were crossed with the *Lr24* one. Three F<sub>1</sub> populations were crossed with four advanced lines giving 765 F<sub>2</sub> progenies on which, marker assisted selection (MAS) was used to select 194 lines containing both resistance genes. After 6 years of classical breeding, MAS was applied to confirm the presence of *Lr9* and/or *Lr24* in 30 of the F<sub>8</sub> remaining lines.

#### Disease evaluation

The lines were evaluated for leaf rust and other diseases in separate nurseries using artificial infection with mixtures of isolates collected in Switzerland as described by MICHEL (2001).

#### Homogeneity

The lines' homogeneity was evaluated comparing plant height, spike and leaves morphology and colour of 30 head-to-row lines. Lines with insufficient uniformity were selfed one to tree more generations before testing them in yield trials.

#### Field trials and bread making quality

Small-plot (7m<sup>2</sup>) trials with 2 replications have been carried out in 4 locations during one year. Samples collected from yield trials were used for quality parameters evaluation

<sup>1</sup> Agroscope Changins-Wädenswil Research Station ACW, Plant Breeding and Genetics Resources, Route de Duillier, P.O. Box 1012, CH-1260 NYON 1

<sup>2</sup> Agroscope Liebefeld-Posieux Research Station ALP, P.O. Box 64, rte de la Tioleyre 4, CH-1725 POSIEUX

\* Ansprechpartner: Dario FOSSATI, dario.fossati@acw.admin.ch

**Table 1: Sequence of primers for STS locus linked to the *Lr9* and *Lr24* resistance genes**

Gene	Name	Primer sequence (5' - 3')	Reference
<i>Lr9</i>	J13	F - CCA CAC TAC CCC AAA GAG ACG R - TCC TTT TAT TCC GCA CGC CGG	SCHACHERMAYR et al. 1994
	SCS5	F - TGC GCC CTT CAA AGG AAG R - TGC GCC CTT CTG AAC TGT AT	GUPTA et al. 2005
<i>Lr24</i>	J09	F - TCT AGT CTG TAC ATG GGG GC R - TGG CAC ATG AAC TCC ATA CG	SCHACHERMAYR et al. 1995
	H05	F - AGT CGT CCC CGA AGA CCC GCT GGA R - TCG TCC CCT GAT GCC ATG TAA TGT	DEDRYVER et al. 1996

involving protein content and Zeleny sedimentation value (ICC 1999).

### DNA extraction

Genomic DNA from the 765  $F_2$  populations was isolated from leaves tissue according to LAGUDAH and APPELS (1991). For the 30 advanced lines, the DNA was extracted with a quick and efficient method. Two young leaves were grown in 2 ml of extraction buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 50 mM pH8, sucrose 15% (w/v), NaCl 250 mM). After centrifugation (5 min at 6000 x g), the supernatant was removed and the pellet, suspended in 340  $\mu$ l of Tris-HCl 20 mM pH8, EDTA 10 mM pH8 and SDS 1.2% (w/v), was incubated for 15 min at 70°C. Then 150  $\mu$ l of 7.5 M ammonium acetate were added, the mixture incubated on ice for 30 min and centrifuged at 16000 x g for 15 min. The DNA from the supernatant was concentrated by ethanol precipitation, washed with 75% (v/v) ethanol and dissolved in TE at a concentration of 25 ng/ $\mu$ l.

### PCR amplification

Polymerase chain reaction (PCR) was performed in 10  $\mu$ l volumes with 25 ng of template, Qiagen PCR buffer and Q-solution as recommended by the manufacturer, 0.2 mM dNTPs, 1  $\mu$ M of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.35 U HotStar Taq DNA polymerase (Qiagen). Amplifications were performed in an Hybaid PX2 thermocycler programmed at 95°C for 15 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, at 64°C for 1 min 30 sec and at 72°C for 2 min 30 sec. The extension of amplified fragment was achieved at 72°C for 10 min. The sequences of the specific primers for *Lr9* and *Lr24* are shown in Table 1.

### Electrophoresis

Amplification products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel in 1 X TAE buffer at 100 V for 3 h and visualized under UV light after ethidium bromide staining.

## Results and discussion

### Homogeneity

At  $F_7$ , only 14.3% of the 98  $F_7$  '*Lr9/Lr24*' lines reached a sufficient uniformity to be tested in yield trials and to start the maintenance breeding compared to 20.6% for the 'normal' lines.

### Leaf rust markers and disease resistance

The MAS at  $F_2$  with dominant PCR-based markers discard the plants without *Lr* genes but cannot sort heterozygous from homozygous plants. Lines without the genes continue to appear after self-pollination of heterozygous plants. The second PCR was performed with accurate concentration of DNA isolated from 6 to 10 plants. For the heterozygous lines, the band intensity was lower than the one obtained with homozygous lines. The heterozygosity of these lines was confirmed by analysing 6 plants separately. For the 30 lines tested in yield trials, 6 lines have markers for *Lr9* and *Lr24*, 10 lines only for *Lr24*, 4 lines only for *Lr9* and 10 lines have no markers for neither resistance genes. In fact, the susceptibility to leaf rust confirmed the role of *Lr9* and *Lr24* in the resistance response. Even though the virulence *Lr9* is now frequently observed in Switzerland (F. MASCHER, unpublished) lines possessing *Lr9* show few or no symptoms. On the other hand, some lines possessing *Lr24* markers display low symptoms even if virulence *Lr24* has not been reported in Switzerland. The few lines with both *Lr* markers have absolutely no symptoms (Figure 1). Arguably the pyramidation of both resistance genes is feasible and the results obtained are efficient but the durability of the resistance has still to be proved. The mean resistance of these lines against other important diseases is very good for stripe rust (score 2.0), *Septoria nodorum* blotch (index leaf 79, index spike 85) and good for *Septoria tritici* blotch (index 91), powdery mildew (score 2.4) and Fusarium head scab (score 3.2).

### Yield trial

The 30 lines mean yield is only 90% of the usual standard cultivars, hence, insufficient for a commercial cultivar. Even if the number of lines is certainly insufficient to compare with confidence the yield between the lines with or without *Lr* markers or between the lines from different crosses we observe that the relative yield for the 6 lines with *Lr9* and *Lr24* markers is 94.2% (86.5% to 100.9%) compared to 88.8% (77.7% to 97.4%) for the 10 lines without *Lr* markers. The 8 lines issued from the cross with the best parent have a 94.1% relative mean yield compared to 80.8% for the 4 lines issued from the lowest yielding parent.

### Bread making quality

The 30 lines Zeleny mean value (60.2 ml; 43.7-73.5 ml) and the protein content mean values (13.5%; 11.7-15.0%) indicate a good to very good bread making quality for the

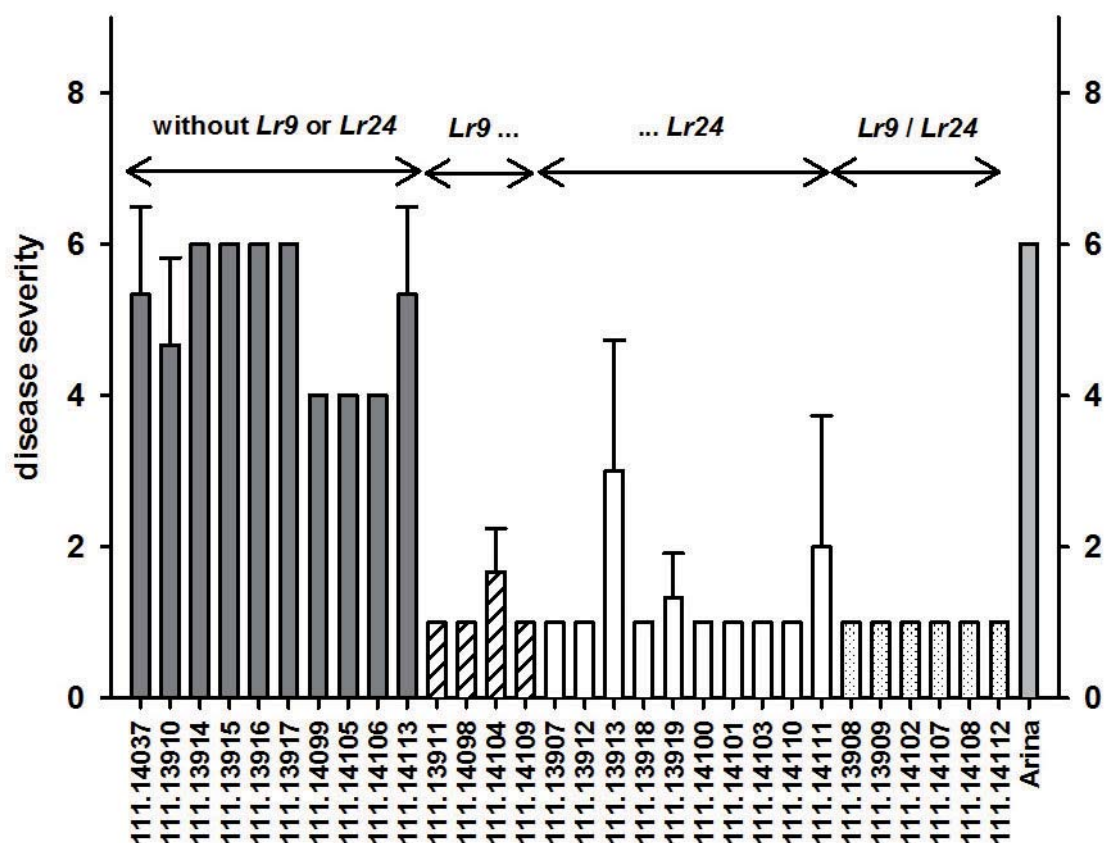


Figure 1: Evaluation of leaf rust resistance (1: no symptom; 9: fully susceptible) of  $F_8$  lines derived from the project of pyramiding of *Lr9* and *Lr24*.

lines compared with the quality standards Arina (52.3 ml, 13.8%) and Runal (65.2 ml, 14.3%).

### Costs

If we don't include costs for markers development and field trials cost (sowing, treatments, sampling), we need now, in our conditions, 1 person, two weeks and a cost of 515.- € for analyzing 1000 samples.

### Conclusions and perspectives

The lines herein obtained, even though displaying good resistances and excellent bread making quality, had low yield and more difficulties to reach uniformity. They could not be developed as commercial cultivars and are used as genitors. The low yield and low uniformity might be unwanted effects of *Lr* genes and of 'drag genes' unintentionally introduced from the wild relative. This is especially valid for the *Lr24* donor where a large segment has been translocated (SCHACHERMAYR et al. 1995). It might be also caused by the genetic value of the advanced lines used as genitors in this experiment. The number of lines tested here is too small to have clear evidences for one or the other hypothesis. Some of the best lines have been crossed with more yielding lines and with lines with other *Lr* genes especially adult plant resistance genes *Lr22a* to combine different kinds of resistance as proposed by HIEBERT et al. (2007). The MAS was effective for pyramiding two resistance genes but the

investment was important just for one of the six important diseases we breed for. Even if the cost of MAS has dropped dramatically during the last decade, it is still a challenge to find the best way to use it in a breeding program with the aim of producing cultivars not only resistant against one single disease but aiming at an optimal combination between yield, resistance and quality.

### References

- DEDRYVER F, JUBIER M-F, THOUVENIN J, GOYEAU H, 1996: Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr24* in different wheat cultivars. *Genome* 39: 830-835.
- GUPTA S, CHARPE A, KOUL S, PRABHU V, MOHD Q, HAQ R, 2005: Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf rust resistance gene, *Lr9*, for marker-assisted selection in bread wheat. *Genome* 48: 823-830.
- HIEBERT C, THOMAS J, SOMERS D, MCCALLUM B, FOX S, 2007: Microsatellite mapping of adult-plant leaf rust resistance gene *Lr22a* in wheat. *Theor Appl Genet* 115: 877-884.
- KOMUGI, 2009: Wheat genetic resources database KOMUGI [Available online: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/>; accessed 18 Nov 2009].
- ICC, 1999: Standard methods. International Association for Cereal Science and Technology (ICC), Vienna.
- LAGUDAH E, APPELS R, 1991: The *Nor-D3* locus of *Triticum tauschii*: natural variation and genetic linkage to markers in chromosome 5. *Genome* 34: 387-395.

- MICHEL V, 2001: La sélection de variétés de blé et de triticales résistantes aux maladies. *Rev Suisse Agric* 33(4): 133-140.
- NOCENTE F, GAZZA L, PASQUINI M, 2007: Evaluation of leaf rust resistance genes *Lr1*, *Lr9*, *Lr24*, *Lr47* and their introgression into common wheat cultivars by marker-assisted selection. *Euphytica* 155: 329-336.
- PEDERSEN WL, LEATH S, 1988: Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. *Ann Rev Phytopathol* 26: 369-378.
- SCHACHERMAYR G, SIEDLER H, GALE MD, WINZELER H, WINZELER M, KELLER B, 1994: Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. *Theor Appl Genet* 88: 110-115.
- SCHACHERMAYR G, MESSMER M, FEUILLET C, WINZELER H, WINZELER M, KELLER B, 1995: Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat. *Theor Appl Genet* 90: 982-990.
- SINGH R, DATTA D, PRIYAMVADA, SINGH S, TIWARI R, 2004: Marker-assisted selection for leaf rust resistance genes *Lr19* and *Lr24* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Appl Genet* 45 (4): 399-403.
- VIDA G, Gál M, SZUNICS L, VEISZ O, 2005: Use of conventional breeding and marker-assisted selection to improve the leaf rust resistance of winter wheat. In: 7<sup>th</sup> International Wheat Conference, Wheat production in stressed environments, 27 November - 2 December, Mar del Plata, Argentina, Abstracts, p. 163.

## Studies on the beta-glucan content of hull-less barley

Heinrich Grausgruber<sup>1\*</sup>, Ingrid Weinzetl<sup>1</sup>, Viola Zahlner<sup>2</sup>, Julia Schmidt<sup>2</sup>,  
Philipp Wurbs<sup>2</sup> und Susanne Siebenhandl-Ehn<sup>2</sup>

### Abstract

The interest in barley food is currently increasing since numerous studies have verified health benefits of barley foods due to beta-glucan, the major soluble fibre component. We investigated the beta-glucan content of 105 hull-less barley genotypes in 14 environments. A significant variation in beta-glucan content was found both for genotypes, as well as for environments and their interaction. However, the genotypic effect was much greater than any other effect. Highest beta-glucan contents were found in 'waxy' varieties and some genetic resources. Data from the multi-environment experiment were also used to establish a NIRS calibration which allows an easy, rapid, reliable and cheap determination of beta-glucan in hull-less barley breeding material in the future.

### Keywords

Cholesterol, dietary fibre, functional food, healthy food, *Hordeum vulgare*, NIRS

### Introduction

Mixed-linkage beta-glucans (BG) are unique to the cell walls of grasses (Poaceae). Especially large amounts are localized in oats (*Avena sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*). Although a minor component of the whole grain, BG can significantly affect industrial utilization of barley. High levels reduce malt extract yields and cause filtration problems at various stages in the brewing process as well as beer hazes. In animal nutrition BG reduces the availability of energy and protein in poultry fed diets (MACGREGOR and FINCHER 1993). On the other hand BG is considered to be nutritionally beneficial in human diets. Barley BG can help to reduce cholesterol (NEWMAN et al. 1989, MCINTOSH et al. 1991, BEHALL et al. 2004, KEENAN et al. 2007, SHIMIZU et al. 2008), control body weight and prevent obesity (SLAVIN 2005, SHIMIZU et al. 2008), reduce glucose and insulin response (BEHALL et al. 2006a, NILSSON et al. 2006), reduce blood pressure (BEHALL et al. 2006b), lower the risk for type 2 diabetes (HINATA et al. 2007, KOCHAR et al. 2007) and promote a prebiotic effect (SNART et al. 2006). In accordance with the EU Regulation No 1924/2006 on nutrition and health claims made on foods a number of entities filed an approval procedure toward registering BG-containing products as

health beneficial products (for further information see <http://registerofquestions.efsa.europa.eu/roqFrontend/questionsListLoader?panel=NDA&foodsectorarea=26>).

In the present study hull-less barley varieties and genetic resources were investigated for their total BG content over various environments and cultivation systems. The aim of the work was to (1) search for barley genetic resources with high genotypic BG levels and to (2) establish a NIRS calibration for BG content.

### Material and methods

Both organic and conventional field trials with a total of 105 hull-less barley genotypes were carried out since 2003 at various sites in eastern Austria. Grain samples were available from 14 environments, i.e. year × site combinations. Grain samples were sifted with a Sortimat laboratory machine (Pfeuffer GmbH, Kitzingen, Germany). Generally, only plump kernels >2.5 mm were used for analysis. Grains were milled into whole-grain flour using a model ZM100 ultra-centrifugal mill (Retsch GmbH & Co KG, Haan, Germany) equipped with a 250 µm sieve.

Total BG content was determined enzymatically using Megazyme kits (Megazyme Int. Ireland Ltd., Bray, Wicklow, Ireland) following the standard method (ICC Standard Method No. 166, AACC Method 32-23, AOAC Method 995.16). In brief, milled barley samples were suspended and hydrated in a sodium phosphate buffer solution of pH 6.5 and incubated with purified lichenase enzyme (specific, endo-(1→3),(1→4)-β-D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.73). An aliquot of the filtrate was then reacted to completion with purified β-glucosidase enzyme (EC 3.2.1.21). The glucose produced was assayed using a glucose/peroxidase (GOPOD) reagent. The BG contents were determined in 3 to 4 replicated measurements and are reported as % on dry basis.

Moreover, whole-grain flour of the samples was subjected to NIR spectra measurement by four different NIRS instruments (Tecator 1241 for transmission measurements, NIR-Systems 6500 for reflectance and transmission measurements (all Foss Analytical AB, Höganäs, Sweden), Matrix I for reflectance measurements (Bruker Optics, Ettlingen, Germany)) with different measuring principles (NIT, dispersive NIR, and FT-NIR) (SCHMIDT et al. 2009). Data from the chemical analyses were statistically analysed by the MIXED procedure of SAS 9.2 software (SAS Institute,

<sup>1</sup> Department of Applied Plant Sciences and Plant Biotechnology, BOKU - University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Gregor-Mendel-Straße 33, A-1180 VIENNA

<sup>2</sup> Department of Food Sciences and Technology, BOKU - University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Muthgasse 18, A-1190 VIENNA

\* Ansprechpartner: Ao.Univ.Prof. Dr. Heinrich GRAUSGRUBER, [heinrich.grausgruber@boku.ac.at](mailto:heinrich.grausgruber@boku.ac.at)

Inc., Cary, NC) with genotype as fixed effect, and environment and genotype by environment interaction as random effects. Mean comparisons were carried out as one-sided (lower performance) Dunnett's t-test using the variety with the highest average performance, i.e. Wanubet, as control.

## Results and discussion

A large variability in BG content (3.4–7.3%) was observed for the investigated plant material. Highest levels of BG were found in some 'waxy' varieties from the USA and Canada. Similar levels were identified in some genetic resources, e.g. Purple Nudum and Lih Dhanra Gal from the Himalaya regions, Debre Zeit AES2 from Ethiopia and Krehls Nacktgerste from Germany (Table 1). Mixed model analysis of variance revealed significant genotypic, environmental and interaction effect. The variance component for genotypes (0.35) was approximately double than that for the interaction term (0.18) and higher than that for environments (0.29). Effects of the environment and genotype by environment interactions have been well established in numerous other studies, although all studies revealed that the genetic background is more important (MORGAN and RIGGS 1981, ÅMAN and GRAHAM 1987, PÉREZ-VENDRELL et al. 1996).

Dispersive NIRS instruments showed suitability for supervision of breeding experiments and BG monitoring in food industries ( $R^2 > 0.78$ ). Industrially used NIT instruments are suitable for only a rough selection. FT-NIRS was able to perform analytical analyses ( $R^2 = 0.96–0.98$ ). For detailed results and discussion see SCHMIDT et al. (2009).

## Conclusions

Levels of BG in several hull-less barley varieties and/or genetic resources are sufficiently high to provide high enough amounts of BG in end products to fulfil the EU requirements for labelling as 'source of fibre' or 'high fibre'. Rapid, reliable and cheap determination of BG by NIRS is possible and should allow an easy screening of a multitude of germplasm in hull-less barley breeding programmes.

## Acknowledgments

Seeds of varieties and/or genetic resources were kindly provided by M. Arndorfer (Arche Noah, Schilttern), M. Baumer (LfL Bayern, Freising), A. Box (Univ. Adelaide), C. Einfeldt (Ackermann, Irlbach), A. Fleck (SZ Donau, Probstdorf), A. Gianinetti (ISC, Fiorenzuola d'Arda), A. Graner (IPK, Gatersleben), W. Kainz (AGES, Linz), K.J.

**Table 1: Best linear unbiased estimators (BLUE) for  $\beta$ -glucan (BG) content (% db) of hull-less barley. Varieties printed in bold are not significantly different from the highest performing variety Wanubet.**

Variety	BG	Variety	BG	Variety	BG
<b>Wanubet</b>	<b>7.29</b>	AE 13	4.89	IPZ 27215-4018	4.39
<b>CDC Candle</b>	<b>6.44</b>	GE 003	4.88	IPZ 25649-4045	4.38
<b>Washonubet</b>	<b>6.44</b>	NG 3.10-7	4.87	57002604	4.35
<b>Purple Nudum</b>	<b>6.23</b>	57002603	4.87	IPZ 25902-4026	4.30
<b>Lih Dhanra Gal</b>	<b>5.98</b>	Ethiopia 179	4.86	57003605	4.29
<b>Debre Zeit AES2</b>	<b>5.87</b>	Indian 3	4.81	IPZ 27837-4016	4.28
<b>Krehls Nacktgerste</b>	<b>5.86</b>	Black Hullless	4.81	57002608	4.26
HB 803	5.58	IPZ 25902-4011	4.80	57002605	4.23
Krim Nacktgerste	5.54	Ethiopia 96	4.76	IPZ 27200-4002	4.22
Armenische Nacktgerste	5.53	57004601	4.68	KM 1910B	4.22
Merlin	5.46	CI 666	4.68	IPZ 27836-4014	4.20
Kraftborn	5.43	IPZ 25904-4037	4.68	57002609	4.17
White Hullless	5.36	57003607	4.67	GE 040 Sel Blaukörnig	4.15
BOKU SNG-04	5.32	IPZ 27501-4011	4.67	KM 2384	4.10
57002601	5.25	Taiga	4.66	57003602	4.07
Murasaki Hadaka	5.23	Gho 1	4.65	IPZ 27424-4006	3.99
IPZ 25902-4012	5.17	Ethiopia 147	4.65	IPZ 25861-4054	3.99
IPZ 27196-4019	5.17	Lawina	4.61	Torrens	3.95
Himalayense 5	5.17	IPZ 27208-4003	4.61	Hora	3.86
57003601	5.17	57003604	4.59	95003-8	3.84
57002602	5.16	00/900/5N	4.56	KM 2074	3.81
Priora	5.14	Sama 9	4.55	Namoi	3.77
57003603	5.12	IPZ 27501-4012	4.55	Italienische Nacktgerste	3.75
BVAL 358163	5.09	57001603	4.53	Nackta	3.72
57002606	5.09	IPZ 27500-4008	4.52	00/900/19/3/7	3.71
Violaceum 2	5.08	KM 1910A	4.50	Digersano	3.64
Hiberna	5.07	57001601	4.47	Deutsche Nacktgerste Großkörnig	3.64
Ethiopia 12	5.04	Rondo	4.44	00/900/19/6/8	3.60
GE 090	5.04	IPZ 25904-4038	4.44	00/900/19/6/11	3.50
BBA 1035	5.00	KM 2283B	4.43	00/900/19/3/13	3.49
57003606	4.99	Addis Ababa 56	4.43	00/900/19/3/1	3.38
KM 2283A	4.94	Black Naked	4.42	00/900/14/3/10	3.37
Taastrup 625	4.94	IPZ 27200-4001	4.42	57002607	3.37
IPZ 25654-4007	4.92	57001602	4.41	00/900/19/6/4	3.37
GE 037	4.91	IPZ 27503-4013	4.40	00/900/19/3/12	3.34

Müller (Getreidzüchtungsforschung Darzau), K. Sato (BGC, Okayama) and K. Vaculova (VUKROM, Kromeriz)

## References

- ÅMAN P, GRAHAM H, 1987: Analysis of total and insoluble mixed-linked (1→3),(1→4)-β-D-glucans in barley and oats. *J Agric Food Chem* 35, 704-709.
- BEHALL KM, SCHOLFIELD DJ, HALLFRISCH J, 2004: Diets containing barley significantly reduce lipids in mildly hypercholesterolemic men and women. *Am J Clin Nutr* 80, 1185-1193.
- BEHALL KM, SCHOLFIELD DJ, HALLFRISCH JG, 2006a: Barley β-glucan reduces plasma glucose and insulin responses compared with resistant starch in men. *Nutr Res* 26, 644-650.
- BEHALL KM, SCHOLFIELD DJ, HALLFRISCH J, 2006b: Whole-grain diets reduce blood pressure in mildly hypercholesterolemic men and women. *J Am Diet Ass* 106, 1445-1449.
- HINATA M, ONO M, MIDORIKAWA S, NAKANISHI K, 2007: Metabolic improvement of male prisoners with type 2 diabetes in Fukushima Prison, Japan. *Diabetes Res Clinical Pract* 77, 327-332.
- KEENAN JM, GOULSON M, SHAMLIYAN T, KNUTSON N, KOLBERG L, CURRY L, 2007: The effects of concentrated barley β-glucan on blood lipids in a population of hypercholesterolaemic men and women. *Br J Nutr* 97, 1162-1168.
- KOCHAR J, DJOUSSÉ L, GAZIANO JM, 2007: Breakfast cereals and risk of type 2 diabetes in the physicians' health study I. *Obesity* 15, 3039-3044.
- MACGREGOR AW, FINCHER GB, 1993: Carbohydrates of the barley grain. In: MacGregor AW, Bhatti RS (eds.), *Barley: Chemistry and technology*, 73-130. Am Ass Cereal Chem, St. Paul, MN.
- MCINTOSH GH, WHYTE J, MCARTHUR R, NESTEL PJ, 1991: Barley and wheat foods: influence on plasma cholesterol concentrations in hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr* 53, 1205-1209.
- MORGAN AG, RIGGS TJ, 1981: Effects of drought on yield and on grain and malt characters in spring barley. *J Sci Food Agric* 32, 339-346
- NEWMAN RK, LEWIS SE, NEWMAN CW, BOIK RJ, RAMAGE RT, 1989: Hypocholesterolemic effect of barley foods on healthy men. *Nutr Rep Int* 39, 749-760.
- NILSSON A, GRANFELDT Y, OSTMAN E, PRESTON T, BJORCK I, 2006: Effects of GI and content of indigestible carbohydrates of cereal-based evening meals on glucose tolerance at a subsequent standardized breakfast. *Eur J Clin Nutr* 60, 1092-1099.
- PÉREZ-VENDRELL AM, BRUFAU J, MOLINA-CANO JL, FRANCESC M, GUASCH J, 1996: Effects of cultivar and environment on β-(1,3)-(1,4)-D-glucan content and acid extract viscosity of Spanish barleys. *J Cereal Sci* 23, 285-292.
- SCHMIDT J, GERGELY S, SCHÖNLECHNER R, GRAUSGRUBER H, TÖMÖSKÖZI S, SALGÓ A, BERGHOFER E, 2009: Comparison of different types of NIR instruments in ability to measure β-glucan content in naked barley. *Cereal Chem* 86, 398-404.
- SHIMIZU C, KIHARA M, AOE S, ARAKI S, ITO K, HAYASHI K, WATARI J, SAKATA Y, IKEGAMI S, 2008: Effect of high β-glucan barley on serum cholesterol concentrations and visceral fat area in Japanese men - A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Plant Foods Hum Nutr* 63, 21-25.
- SLAVIN JL, 2005: Dietary fiber and body weight. *Nutrition* 21, 411-418.
- SNART J, BIBILONI R, GRAYSON T, LAY C, ZHANG H, ALLISON GE, LAVERDIERE JK, TEMELLI F, VASANTHAN T, BELL R, TANNOCK GW, 2006: Supplementation of the diet with high-viscosity beta-glucan results in enrichment for Lactobacilli in the rat cecum. *Appl Env Microbiol* 72, 1925-1931.

# Entwicklung und Validierung von diagnostischen Markern für das *Rrs2*-Resistenzgen gegen *Rhynchosporium secalis* in Gerste

## Development and validation of diagnostic markers for the *Rrs2* gene in barley conferring resistance to *Rhynchosporium secalis*

Anja Hanemann<sup>1\*</sup>, Günther F. Schweizer<sup>2</sup> und Marion S. Röder<sup>1</sup>

### Abstract

The *Rrs2* gene conferring dominant resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*) in barley was fine mapped using 9179 F<sub>2</sub>-plants (Atlas × Steffi) to the distal end of chromosome 7HS. Additionally, two barley BAC contigs flanking the resistance gene were established by chromosome walking. A sequence analysis of 58 barley genotypes revealed a large linkage block at the *Rrs2* locus extending over several hundred kb which is present only in *Rrs2* carrying cultivars. The variety analysis also led to the identification of eight SNPs which were diagnostic for the *Rrs2* phenotype. Based on these SNPs diagnostic molecular markers (CAPS and pyrosequencing markers) were developed. All markers have been successfully tested in a diverse set of common barley varieties and landraces. They are a highly useful tool for marker-assisted selection in resistance gene pyramiding programmes for *Rhynchosporium secalis* resistance in barley.

### Keywords

*Hordeum vulgare*, resistance gene *Rrs2*, *Rhynchosporium secalis*, scald

### Einleitung

Die *Rhynchosporium*-Blattfleckenkrankheit, welche durch den Pilz *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis verursacht wird, zählt zu einer der wichtigsten Gerstenkrankheiten der gemäßigten Klimazonen (SHIPTON 1974). Bisher wurden mehrere Resistenzgene gegen *R. secalis* in Gerste kartiert. Zu den vier wirksamsten ist neben *Rrs1* (3H; BJØRNSTAD et al. 2002), *Rrs13* (6H; ABBOTT et al. 1992; GINGER et al. 2003) und *Rrs15* (2H; SCHWEIZER et al. 2004) auch *Rrs2* einzustufen. Das Gen kartiert am distalen Ende des kurzen Arms von Gerstenchromosom 7H (SCHWEIZER et al. 1995; SCHMIDT et al. 2001). Die durch das *Rrs2*-Gen vermittelte Resistenz wurde von dem sehr anpassungsfähigen Pilz *R. secalis* in Deutschland bisher noch nicht durchbrochen und könnte daher zur Pyramidisierung von Resistenzgenen gegen die *Rhynchosporium*-Blattfleckenkrankheit eingesetzt werden.

Die Klonierung von *Rrs2* bzw. die Entwicklung diagnostischer molekularer Marker würde diesen Züchtungsaufwand erheblich erleichtern.

Im Folgenden soll neben der Feinkartierung des *Rrs2*-Gens und der Erstellung der physikalischen Karte vor allem auf die Sortenanalyse und die Entwicklung diagnostischer Marker für den Einsatz in der Resistenzzüchtung eingegangen werden.

### Material und Methoden

Die Kartierungspopulation bestand aus einer Kreuzung der resistenten, sechszeiligen, amerikanischen Sorte Atlas (CI 4118) mit der für *Rhynchosporium* anfälligen, bayerischen, zweizeiligen Braugerstensorte Steffi (Saatzucht Ackermann, Irlbach). Die Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation wurden geselbstet und die F<sub>2</sub>-Nachkommenschaft auf Rekombination zwischen flankierenden Markern untersucht. Pflanzen ab der F<sub>4</sub>-Generation, in denen die identifizierten Rekombinationsereignisse im homozygoten Zustand vorlagen, wurden auf *Rhynchosporium*-Resistenz getestet. Die Tests wurden an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Freising/Weihenstephan (LfL Bayern) nach SCHWEIZER et al. (1995) durchgeführt.

Zur Erstellung der physikalischen Karte wurde hauptsächlich eine BAC-Bibliothek der Sorte Morex (YU et al. 2000) verwendet. Zusätzlich stammt ein BAC-Klon aus der Cebada Capa BAC-Bibliothek (ISIDORE et al. 2005) und jeweils ein Klon aus zwei unveröffentlichten BAC-Bibliotheken der Sorte Morex, welche in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Genomdiversität des IPK Gatersleben identifiziert wurden.

Die in der Sortenanalyse untersuchten 58 Gerstengenotypen wurden entweder in Form von Saatgut von verschiedenen Genbanken (Genbank Gatersleben, Australian Winter Cereals Collection und BBSCR Cereals Collection des John Innes Centres) oder als DNA-Proben von Dr. Günther Schweizer (LfL Bayern) bezogen. Sechs Genomregionen aus der unmittelbaren Umgebung von *Rrs2* wurden von allen Akzessionen sequenziert und mithilfe des Alignment-Programms Sequencher™ vers. 4.5 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) auf Polymorphismen untersucht.

<sup>1</sup> Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Corrensstraße 3, D-06466 GATERSLEBEN

<sup>2</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), IPZ1b Genomanalyse, Am Gereuth 2, D-85354 FREISING

\* Ansprechpartner: Anja HANEMANN, hanemann@ipk-gatersleben.de



Die statistische Analyse der Assoziation der gefundenen SNPs mit dem *Rrs2*-Phänotyp fand unter Annahme eines General Linear Models (GLM) mit dem Programm TASSEL vers. 2.0.1 (BRADBURY et al. 2007; <http://www.maizegenetics.net>) statt.

Für die CAPS-Markerentwicklung wurde das Programm SNP2CAPS (THIEL et al. 2004) verwendet, welches Restriktionsschnittstellen an SNP-Positionen detektiert. Die Pyrosequenziermarkerentwicklung erfolgte mit der Assay Design Software vers. 1.0.6 (Biotage AB, Uppsala, Sweden).

## Ergebnisse und Diskussion

### Feinkartierung und Erstellung einer physikalischen Karte der *Rrs2*-Region

Mit einer 9179 F<sub>2</sub>-Pflanzen umfassenden Kartierungspopulation aus einer Kreuzung der resistenten Sorte Atlas mit der anfälligen Sorte Steffi wurde das *Rrs2*-Gen in einen 0,08 cM großen Bereich zwischen die Marker 693M6\_6 und P1D23R feinkartiert. Zugleich konnte das distale BAC-Contig der bereits vorhandenen physikalischen Karte der *Rrs2*-Region um vier zusätzliche BAC-Klone erweitert werden.

Alle in dem 0,08 cM großen Bereich zwischen den Markern 693M6\_6 und P1D23R befindlichen Marker co-segregieren mit dem *Rrs2*-Gen. Allerdings liegen die flankierenden Marker der co-segregierenden Region mehrere hundert Kilobasen voneinander entfernt, da sie auf zwei nicht überlappenden BAC-Contigs lokalisiert sind. Die Ergebnisse der Feinkartierung und physikalischen Kartierung führen zu dem Schluss, dass die Region um das *Rrs2*-Gen in der Atlas × Steffi Kartierungspopulation eine unterdrückte Rekombination aufweist. Eine genauere Lokalisation von *Rrs2* war deshalb mittels Map Based Cloning Strategie nicht möglich (HANEMANN et al. 2009).

### Sequenzanalyse von Sorten

Mithilfe von Populationen aus verschiedenen Stämmen oder Sorten kann, im Gegensatz zu klassischen Kartierungspopulationen, ein deutlich breiterer genetischer Hintergrund aufgrund mehr informativer Meiosen untersucht, und damit eine höhere genetische Auflösung erreicht werden (GAUT und LONG 2003). Die Sequenzanalyse wurde gezielt für die Region um den *Rrs2*-Locus mit 58 Gerstengenotypen unterschiedlichster Resistenzeigenschaften gegenüber *R. secalis* durchgeführt. Die Gerstensorten wurden auf Polymorphismen (SNPs und INDELS) in sechs Genomregionen aus dem mit *Rrs2* co-segregierenden Bereich bzw. aus dessen unmittelbarer Umgebung untersucht. Da alle 11 bekannten *Rrs2*-Träger (und nur diese) für alle sechs untersuchten Bereiche immer demselben Haplotyp angehörten, konnte, entgegen der ursprünglichen Erwartung, auch die Sequenzanalyse der Sorten keine zusätzlichen Hinweise auf die genaue Position von *Rrs2* liefern. Alle Sorten ohne *Rrs2*-Resistenz gehörten für jede untersuchte Region unterschiedlichen Haplotypen an. Somit besteht die Annahme, dass nur bei *Rrs2*-Resistenz tragenden Sorten ein Haplotypenblock vorliegt, der ohne Rekombination immer geschlossen weitervererbt wird. Neben den bereits als *Rrs2*-Trägern bekannten Sorten fanden sich noch drei weitere Sorten mit dem für *Rrs2*-Sorten charakteristischen SNP-Muster (Tabelle 1). Da diese Sorten, namentlich Atlas 54 (CI 9556), Turk × Atlas (CI 7189) und Wisconsin Winter × Glabron (CI 8162), auch resistent gegen *R. secalis* sind, wird angenommen, dass auch sie das *Rrs2*-Gen tragen. Dies muss jedoch durch Kartierungsstudien bestätigt werden.

Es wird vermutet, dass der Haplotypenblock und die unterdrückte Rekombination in der Kartierungspopulation Folge einer chromosomalen Veränderung (z.B. chromosomale Inversion) in den Sorten mit *Rrs2*-Resistenz sind. Aufgrund des identischen SNP-Musters in diesen Sorten liegt die Abstammung von einer einzigen Gerstenlinie nahe. Hinweise auf einen gemeinsamen Vorfahren aus Nordafrika lassen

Tabelle 1: Liste der resistenten Sorten, welche das *Rrs2*-Gen tragen

Table 1: List of resistant varieties carrying the *Rrs2* gene

<i>Rrs2</i> -Träger (Sortenname mit CI-Nummer bzw. Abstammung)	Nachweis des Vorliegens von <i>Rrs2</i>
Atlas (CI 4118)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Atlas 46 (CI 7323)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Atlas 54 (CI 9556)	Sequenzanalyse
CI 2235	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Digger (Magnif-E-105/Universe (MMG-68-5-11)//Aramir)	W. Thomas (SCRI, Dundee, UK, pers. Mitt.) und Sequenzanalyse
Escaladura 15 (Landsorte)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Forrest (Atlas 57//Prior/Ymer)	Infektion mit differenziellen Pilzisolaten (H. Wallwork, SARDI, Adelaide, pers. Mitt.) und Sequenzanalyse
Gloria LB Iran × Harrington (LBIran/Una827//Gloria/Come/3/Harrington)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Livet (22746C041/TSS 311-54E) bzw. (Dera/Digger//TS-42-3-5/Armelle)	W. Thomas (SCRI, Dundee, UK, pers. Mitt.) und Sequenzanalyse
Osiris (CI 1622)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Pewter (NFC 94-20/NFC 94-11)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
PI 452395 (Züchterlinie aus England)	Kartierung (LfL Bayern, unveröff.) und Sequenzanalyse
Turk × Atlas (CI 7189)	Sequenzanalyse
Wisconsin Winter × Glabron (CI 8162)	Sequenzanalyse

sich auch in den entsprechenden Stammbäumen finden (HANEMANN et al. 2009).

### Markerentwicklung für *Rrs2*

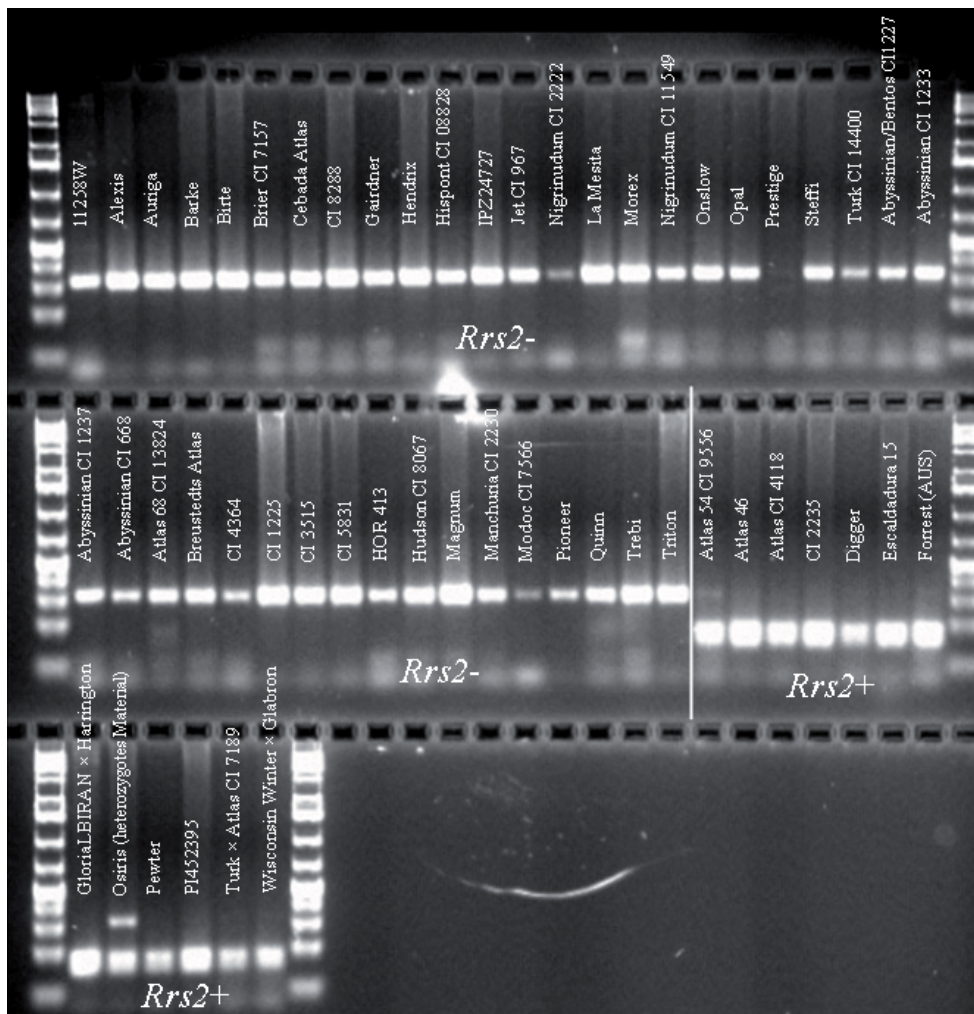
In der Sortenanalyse wurden insgesamt acht diagnostische SNPs für den *Rrs2*-Phänotyp in drei Genomregionen des co-segregierenden Bereichs entdeckt. Die statistische Analyse (GLM) konnte eine hoch signifikante Beziehung der acht SNPs mit dem *Rrs2*-Phänotyp aufzeigen (Tabelle 2).

Infolgedessen wurden, basierend auf fünf SNPs, acht diagnostische molekulare Marker für das *Rrs2*-Gen entwickelt und getestet. Alle Marker konnten erfolgreich aus insgesamt 54 getesteten Genotypen alle 13 Genotypen diskriminieren, welche eine *Rrs2*-Resistenz trugen (Abbildung 1). Diese fünf CAPS-Marker und drei Pyrosequenziermarker können zur Selektion auf *Rrs2*-Resistenz in Gerstenlinien während des Züchtungsprozesses eingesetzt werden und sind vor allem für Pyramidisierungsprogramme von *Rhynchosporium*-Resistenzgenen ein wertvoller Hinzugewinn.

**Tabelle 2: Übersicht über signifikant mit dem *Rrs2*-Phänotyp assoziierte SNPs aus drei Genomregionen des *Rrs2*-Lokus auf Gerstenchromosom 7HS und die daraus entwickelten Marker (P-Werte für alle SNPs zu finden in HANEMANN et al. (2009))**

**Table 2: Overview of significantly associated SNPs with the *Rrs2* phenotype originating from three genomic regions of the *Rrs2* locus on barley chromosome 7HS and the developed markers (P values for all SNPs are given in HANEMANN et al. (2009))**

SNP-Position	P-Wert Genomregion 2	Marker
9	$2.9887 \times 10^{-16}$	1 CAPS + 1 Pyro
15	$1.12 \times 10^{-04}$	1 CAPS
28	$3.97 \times 10^{-15}$	
	P-Wert Genomregion 4	
4	$2.99 \times 10^{-16}$	2 CAPS + 1 Pyro
	P-Wert Genomregion 5	
5	$2.99 \times 10^{-16}$	1 Pyro
13	$2.99 \times 10^{-16}$	
16	$2.99 \times 10^{-16}$	1 CAPS
17	$2.99 \times 10^{-16}$	



**Abbildung 1: Beispiel für den Markertest mit 54 Gerstengenotypen (13 davon tragen das *Rrs2*-Gen) anhand eines CAPS-Markers für Genomregion 4 basierend auf dem Restriktionsverdau mit dem Enzym BspI68**

**Figure 1: The marker testing with 54 barley genotypes (13 of which carry the *Rrs2* gene) taking CAPS marker for genomic region 4 based on restriction digestion with enzyme BspI68 as an example**

## Literatur

- ABBOTT DC, BROWN AHD, BURDON JJ, 1992: Genes for scald resistance from wild barley (*Hordeum vulgare* spp. *spontaneum*) and their linkage to isozyme markers. *Euphytica* 61, 225-231.
- BJØRNSTAD Å, PATIL V, TEKAUZ A, MARØY AG, SKINNES H, JENSEN A, MAGNUS H, MACKEY J, 2002: Resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*) in barley (*Hordeum vulgare*) studied by near-isogenic lines: I. markers and differential isolates. *Phytopathol* 92, 710-720.
- BRADBURY PJ, ZHANG Z, KROON DE, CASSTEVENS TM, RAMDOSS Y, BUCKLER ES, 2007: TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23, 2633-2635.
- GAUT BS, LONG AD, 2003: The lowdown on linkage disequilibrium. *Plant Cell* 15:1502-1506.
- GENGER RK, BROWN AHD, KNOGGE W, NESBITT K, BURDON JJ, 2003: Development of SCAR markers linked to a scald resistance gene derived from wild barley. *Euphytica* 134, 149-159.
- HANEMANN A, SCHWEIZER GF, COSSU R, WICKER T, RÖDER MS, 2009: Fine mapping, physical mapping and development of diagnostic markers for the *Rrs2* scald resistance gene in barley. *Theor Appl Genet* 119, 1507-1522.
- ISIDORE E, SCHERRER B, BELLECA, BUDIN K, FAIVRE-RAMPANT P, WAUGH R, KELLER B, CABOCHE M, FEUILLET C, CHALHOUB B, 2005: Direct targeting and rapid isolation of BAC clones spanning a defined chromosome region. *Funct Integr Genomics* 5, 97-103.
- SCHMIDT D, RÖDER MS, DARGATZ H, WOLF N, SCHWEIZER GF, TEKAUZ A, GANAL MW, 2001: Construction of a YAC library from barley cultivar Franka and identification of YAC-derived markers linked to the *Rh2* gene conferring resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*). *Genome* 44, 1031-1040.
- SCHWEIZER GF, BAUMER M, DANIEL G, RUGEL H, RÖDER MS, 1995: RFLP markers linked to scald (*Rhynchosporium secalis*) resistance gene *Rh2* in barley. *Theor Appl Genet* 90, 920-924.
- SCHWEIZER G, HERZ M, MIKOLAJEWSKI S, BRENNER M, HARTL L, BAUMER M, 2004: Genetic mapping of a novel scald resistance gene *Rrs15*<sub>C18288</sub> in barley. In: Spunar J, Janikova J (eds) *Proc 9<sup>th</sup> Int Barley Genet Symp*, 20-26 June, Brno, Czech Republic, pp 258-265. *Agric Res Inst Kromeriz*.
- SHIPTON WA, 1974: Scald of barley. *Rev Plant Pathol* 53:839-861.
- THIEL T, KOTA R, GROSSE I, STEIN N, GRANER A, 2004: SNP2-CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. *Nucleic Acids Res* 32:e5: DOI:10.1093/nar/gnh006.
- YU Y, TOMKINS JP, WAUGH R, FRISCH DA, KUDRNA D, KLEINHOF A, BRUEGGEMAN RS, MUEHLBAUER GJ, WISE RP, WING RA, 2000: A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes. *Theor Appl Genet* 101, 1093-1099.

# Keimfähigkeit, Triebkraft, Feldaufgang und Steinbrandbefall bei Winterweizen mit unterschiedlicher Saatgutqualität, Brandsporenbelastung und Saatgutbehandlung im Öko-Landbau

## Germination, Vigour, Field Emergence and *Tilletia caries* Infestation of diverse Winter Wheat Seed Qualities, artificial Spore Contamination and Seed Treatment in Organic Farming

Johannes Hertrich<sup>1</sup>, Benno Voit<sup>2</sup>, Berta Killermann<sup>2\*</sup>

### Abstract

Common bunt of wheat (*Tilletia caries*) is the most important disease in organic farming causing great damages in quality and yield in many cases. Therefore seed treatment gets more and more important. Two different seed treatments Tillecur® and Cerall® have been tested in the laboratory and in the field with respect to their effect on germination capacity, vigour, field emergence, yield and common bunt infestation of wheat. Two winter wheat seed lots (one variety) with nearly the same germination capacity (96 %), but considerably different vigour values (96 % and 56 %), were used in this study. Additionally the seeds were infested artificially with common bunt spores (20 and 100 spores per kernel, respectively) in order to determine treatment effectiveness. Seed treatment with Tillecur® effects the best results in vigour, field emergence and *Tilletia* spores infestation at the harvested crop.

### Keywords

Common bunt, seed treatment, *Triticum aestivum*

### Einleitung

Steinbrand (*Tilletia caries*) ist bei Weizen die wichtigste samenbürtige Krankheit im ökologischen Landbau. Bei Verwendung von nicht untersuchtem und unbehandeltem Nachbasaatgut kann es zu erheblichen Ertrags- und Qualitätseinbußen kommen. Neben dem Senfmehl-Präparat Tillecur®, dessen Wirksamkeit in zahlreichen Versuchen bestätigt wurde, steht seit 2007 mit Cerall® ein weiteres biologisches Pflanzenstärkungsmittel auf Basis des Bakteriums *Pseudomonas chlororaphis* zur Saatgutbehandlung zur Verfügung. Zwei Winterweizenpartien mit nahezu gleicher Keimfähigkeit, jedoch unterschiedlicher Triebkraft wurden mit den Präparaten behandelt und im Labor sowie im Feld getestet.

### Material und Methoden

Als Saatgut wurden zwei Partien von einer für Steinbrand anfällig geltenden Winterweizensorte unterschiedlicher

Saatgutqualität ausgewählt. Die unterschiedliche Saatgutqualität bezieht sich auf die Triebkraft. Die gute Partie hatte eine Triebkraft von 96 %, demgegenüber wies die weniger gute Partie eine Triebkraft von nur 56 % auf. In der Keimfähigkeit bestand mit 96 bzw. 95 % kein Unterschied.

Die beiden Partien wurden jeweils mit Cerall® und Tillecur® behandelt. Eine weitere Variante war die Infektion mit Steinbrandsporen (*Tilletia caries*). Neben der Kontrolle wurden die Proben mit 20 bzw. 100 Sporen pro Korn infiziert.

Im Labor erfolgte die Bestimmung der Keimfähigkeit und Triebkraft. Parallel zu den Untersuchungen im Labor erfolgte ein Anbau der verschiedenen Varianten im Feld. Der Feldversuch wurde als Streifenanlage mit 3-facher Wiederholung auf 6 m<sup>2</sup> Parzellen angebaut. Die Kriterien für den Feldversuch waren der Feldaufgang, die Ertragsermittlung und der Befall mit Brandsporen am Erntegut (Anzahl Sporen pro Korn).

Die Bestimmung der Brandsporen am Erntegut erfolgte mit der Filtrationsmethode (ISTA Handbook on Seed Health Testing, Working Sheet No 53) nach ISTA (International Seed Testing Association).

### Ergebnisse und Diskussion

Da die Keimergebnisse der beiden Saatgutpartien im unbehandelten Zustand mit 96 bzw. 95 % relativ hoch sind war ein Einfluss der Saatgutbehandlung mit Tillecur® bzw. Cerall® nicht zu erwarten. Dies traf im Keimversuch auch zu. Ein negativer Einfluss der Saatgutbehandlung auf die Keimfähigkeit war ebenfalls nicht zu beobachten.

Anders verhält es sich bei der Triebkraft. Die Partie mit der hohen Triebkraft (96 %) zeigte auf die Saatgutbehandlungen keine positive Wirkung. Bei der Partie mit der niedrigen Triebkraft (56 %) nahm durch die Tillecur®-Behandlung die Triebkraft von 56 auf 95 % zu. Ein deutlich niedrigerer Effekt war mit der Cerall®-Behandlung zu beobachten. Hier nahm die Triebkraft von 56 auf 69 % zu.

Das weitere Versuchsglied, die zusätzliche Infektion mit Steinbrandsporen in unterschiedlichen Stufen (20 bzw. 100

<sup>1</sup> Fachhochschule Weihenstephan, Fakultät Gartenbau und Lebensmitteltechnologie, Am Staudengarten 10, D-85350 FREISING

<sup>2</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Vöttinger Straße 38, D-85354 FREISING

\* Ansprechpartner: Berta KILLERMANN, berta.killermann@LfL.bayern.de

Sporen pro Korn) wirkte sich auf die Keimfähigkeits- und Triebkrafteergebnisse im Labor nicht aus.

Beim Feldaufgang konnten große Unterschiede zwischen den verschiedenen Varianten beobachtet werden. Bei der guten Saatgutqualität wurden in der Kontrolle 235 Keimpflanzen gezählt. Durch die Behandlung mit Tillecur® bzw. Cerall® erhöhte sich der Feldaufgang auf 265 bzw. 285 Keimpflanzen.

Bei der schlechten Saatgutqualität ergab die Kontrolle 190 Keimpflanzen pro m<sup>2</sup>, mit der Tillecur®-Behandlung stieg der Feldaufgang auf 260 Keimpflanzen an, während bei der Cerall®-Behandlung der Feldaufgang bei nur 210 Keimpflanzen lag (Abbildung 1). Die Unterschiede im Feldaufgang zwischen den verschiedenen Behandlungen waren optisch gut zu erkennen.

Der Ertrag in den einzelnen Parzellen wurde durch die Saatgutqualität beeinflusst. Varianten mit der guten Qualität hatten einen signifikant höheren Ertrag als die Varianten mit der niedrigen Qualität. Darüber hinaus wurde eine Wechselwirkung zwischen der Saatgutqualität und der Saatgutbehandlung festgestellt. So hatten die Saatgutbehandlungsmittel bei der guten Saatgutqualität keine Auswirkungen auf den Ertrag. Innerhalb der niedrigen Qualität erreichten die Tillecur®-Varianten jedoch signifikant höhere Erträge als die unbehandelten- oder Cerall®-Varianten (Abbildung 2).

Die künstliche Saatgutinfektion hatte ebenfalls einen Einfluss auf den Ertrag. Varianten, die mit 20 bzw. 100 Sporen/Korn infiziert waren, erreichten signifikant geringere Erträge als Kontrollvarianten ohne künstliche Infektion.

Der Befall am Erntegut (Anzahl Sporen/Korn) wurde signifikant durch die Saatgutbehandlung und künstliche Saatgutinfektion beeinflusst (DRESSLER et al. 2009). Die beiden Behandlungen zeigten eine starke Wechselwirkung. Bei den unbehandelten und Cerall®-Varianten führte die künstliche Infektion mit 100 Sporen/Korn zu einem signifikant höheren Sporenbesatz am Erntegut als die Infektion mit 20 Sporen/Korn (DRESSLER et al. 2009). Mit der Tillecur®-Behandlung konnten keine Unterschiede bei den verschiedenen Infektionsstufen beobachtet werden. Außerdem wiesen diese Behandlungen allgemein signifikant geringere Sporenmengen am Erntegut auf als die unbehandelte Variante oder die Cerall®-Behandlung. Zwischen der Kontrolle und den Cerall®-Behandlungen konnten keine signifikanten Unterschiede auf den Befall mit Sporen am Erntegut festgestellt werden (Abbildung 3).

## Zusammenfassung und Hinweise für die Praxis

Beste Voraussetzung für einen steinbrandfreien Weizenbestand im ökologischen Landbau ist in erster Linie die Verwendung von Zertifiziertem Saatgut. Damit ist eine hohe Keimfähigkeit und Triebkraft garantiert sowie ein Steinbrandsporenbefall unterhalb dem Schwellenwert von 20 Sporen pro Korn. Die Verwendung von Nachbauseatgut lohnt sich im ökologischen Landbau nicht. Wird trotzdem Nachbauseatgut eingesetzt ist eine Triebkraft- und Brandsporenbestimmung unerlässlich (DRESSLER et al. 2009). Zusätzlich empfiehlt sich eine Saatgutbehandlung

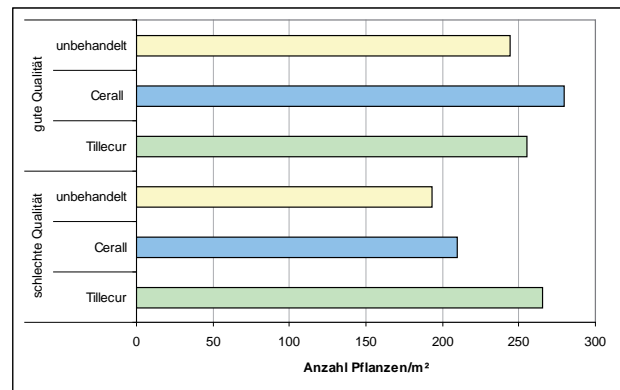


Abbildung 1: Keimpflanzen/m<sup>2</sup> bei guter und schlechter Saatgutqualität mit Tillecur®- und Cerall®-Behandlung

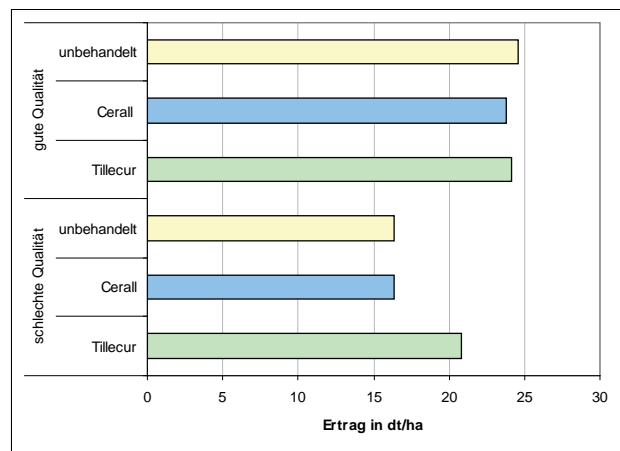


Abbildung 2: Einfluss von Saatgutqualität und Saatgutbehandlung auf den Ertrag

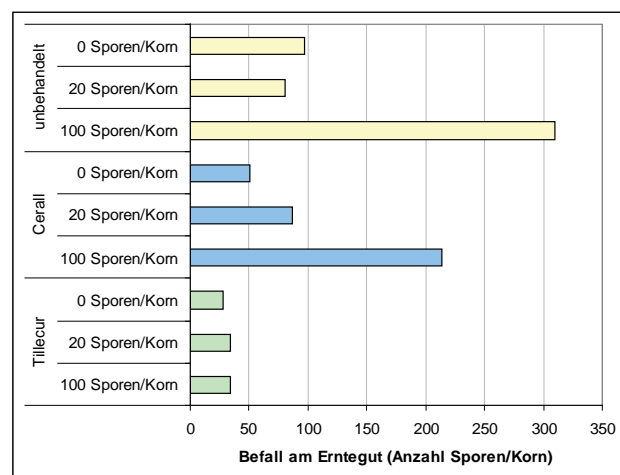


Abbildung 3: Einfluss von Saatgutbehandlung und künstlicher Infektion auf den Befall am Erntegut

mit dem biologischen Pflanzenstärkungsmittel Tillecur®, das den Feldaufgang verbessert und einen Befall mit Steinbrand weitgehend verhindert. Für eine Saatgutbehandlung mit Tillecur® spricht auch die Möglichkeit einer Vorratsbeizung. Saatgut, das mit Tillecur® behandelt wurde, kann in trockenem Zustand über mehrere Wochen gelagert werden. Die Wirksamkeit des Mittels wird dabei nicht beeinträchtigt.

Eine Saatgutbehandlung mit Cerall® sollte hingegen zeitnah vor der Aussaat erfolgen, da davon ausgegangen werden muss, dass die Pseudomonas-Bakterien durch eine trockene Lagerung in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt werden.

## Literatur

ISTA (International Seed Testing Association): Handbook on Seed Health Testing, Working Sheet No 53, Zürich, Schweiz.

DRESSLER M, VOIT B, KILLERMANN B, 2009: Strategien gegen Steinbrand und Zwergsteinbrand im ökologischen Getreidebau. Öko-Landbau-Tag 2009 der Bayerischen Landesanstalt für Land-

wirtschaft (LfL) am 28. April 2009 in Freising-Weihenstephan. LfL Schriftenreihe ISSN 1611-4159.

DRESSLER M, SEDLMEIER M., VOIT B, BÜTTNER P, KILLERMANN B, 2009: Erarbeitung von Schwellenwerten zur wirksamen Bekämpfung von Zwergsteinbrand (*Tilletia controversa*) und Steinbrand (*Tilletia caries*) sowie deren praktische Umsetzung im Öko-Landbau. Beiträge zur 10. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Zürich, Schweiz, Band I, 332-335. ISBN FiBL 978-3-03736-033-0.

DRESSLER M, KILLERMANN B, 2009: Erarbeitung von Schwellenwerten zur wirksamen Bekämpfung von Zwergsteinbrand (*Tilletia controversa*) und Steinbrand (*Tilletia caries*) sowie deren praktische Umsetzung im Öko-Landbau. VDLUFA Schriftenreihe Band 64, 642-647.

# Untersuchungen zur genetischen Variabilität von Parametern im Zusammenhang mit Trockenstressresistenz bei Gerste

## Investigations of the genetic variability of barley concerning resistance to drought stress

Gabriela Reichenberger<sup>1</sup>, Birte Aschenbach<sup>1</sup>, Günther Schweizer<sup>1</sup>,  
Chris-Carolin Schön<sup>2</sup>, Urs Schmidhalter<sup>3</sup> und Markus Herz<sup>1\*</sup>

### Abstract

Aim of this study is to identify and validate methods to screen and select for resistance to drought stress in barley. For this purpose a collection of 78 spring barley accessions was tested for the variability of important parameters. A rain out shelter was used to simulate reproducible drought stress under almost natural conditions. In a second trial the barley genotypes were chemically treated to induce drought stress under the conditions of a breeder's nursery. A further exact simulation of weather conditions was performed in a climate chamber where a selection of three extreme genotypes was subjected to drought stress. The three approaches were compared in terms of parameters which are related to the reaction of plants to drought stress.

### Keywords

Chemical desiccation, drought stress, *Hordeum vulgare*, molecular markers, rain-out-shelter

### Einleitung

Im Zusammenhang mit der Resistenz gegen Trockenstress spielt bei der Sommergerste (*Hordeum vulgare* L.) aufgrund ihrer überwiegenden Verwendung als Braugerste nicht nur die Erhaltung des Ertrags eine große Rolle sondern insbesondere die Sicherung eines hohen Qualitätsniveaus. Trockenstress beeinflusst neben der Bestockung der Pflanzen auch die Kornausbildung (PASSIOURA 2004) und damit die Malzqualität. Die Grundlage für die Aufklärung des genetischen Hintergrundes von Stresstoleranz und deren züchterische Bearbeitung ist eine ausreichende genetische Variabilität. Verschiedene Ansätze zur Induktion von Trockenstress wurden genutzt um die Variabilität wichtiger Parameter unter Trockenbedingungen zu untersuchen.

### Methoden und Ergebnisse

#### *Rain-Out-Shelter*

Das Rain-Out-Shelter ist ein Foliengewächshaus, das mobil auf Schienen gebaut wurde. So ist es möglich, Trockenstress

unter natürlichen Bedingungen reproduzierbar zu erzeugen. Als Standort des Hauses wurde ein Flurstück mit sehr guten Böden und hoher Wasserspeicherfähigkeit ausgewählt. Das Haus fährt sensorgesteuert bei Regen über den Bestand und schützt diesen vor Niederschlägen. Hangwasser wird mittels einer Drainage abgeleitet.

Der Versuch im Jahr 2009 bestand aus 78 Sommergerstensorten in drei Wiederholungen. Zusätzlich zum Rain-Out-Shelter wurde der Versuch an zwei weiteren Standorten als Kontrolle in zwei Wiederholungen angebaut. Während der Vegetationsperiode wurden verschiedene Parameter gemessen und bonitiert. Darunter wurden sensorische und thermische Messverfahren (SPAD-Meter, Oberflächentemperaturmessung) getestet und wichtige agronomische Parameter (Ährenschieben, Lager, Reife) bonitiert. Nach der Ernte wurden ertragsrelevante Daten und Qualitätsparameter wie der Proteingehalt und das <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C-Verhältnis der Pflanzen ermittelt. Über dieses Verhältnis kann die Wassernutzungseffizienz (WUE) der Pflanzen bestimmt werden. Je mehr schweren Kohlenstoff die Pflanze aufnimmt, umso höher war der Trockenstress für die Pflanze.

Mit einem SPAD-Meter (Minolta SPAD 502) wurden an den Genotypen im Rain-Out-Shelter und den Kontrollen Messungen des Chlorophyllgehaltes durchgeführt (*Abbildung 1*). Während die Werte sich in dem Zeitraum von Ende Mai bis Anfang Juni kaum verändern, sinken die Werte Mitte Juli rapide ab. Das Chlorophyll in den Pflanzen wird abgebaut. Bei einem frühzeitigem Abbau von Chlorophyll unter Trockenstress ist das SPAD-Meter eine kostengünstige Selektionsmethode.

In *Abbildung 2* sind die Ertragsergebnisse, sowie der Proteingehalt der jeweiligen Sorte aufgetragen. Die Ergebnisse stammen aus dem Versuchsjahr 2009. Der Rohproteingehalt wurde durch Nahinfrarotspektroskopie gemessen. Zwischen den Sorten sind signifikante Unterschiede bezüglich des Ertrages und des Rohproteingehaltes zu erkennen. Die Ergebnisse zwischen Rain-Out-Shelter und Kontrolle unterschieden sich im Jahr 2009 nicht signifikant voneinander. Weitere Versuchsjahre werden Aufschluss über Jahrgangseffekte geben.

<sup>1</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, IPZ 2b/1b, Am Gereuth 8, D-85354 FREISING

<sup>2</sup> Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, Technische Universität München, Emil-Ramann-Straße 4, D-85350 FREISING

<sup>3</sup> Lehrstuhl für Pflanzenernährung, Technische Universität München, Am Hochanger 2, D-85350 FREISING

\* Ansprechpartner: Dr. Markus HERZ, markus.herz@lfl.bayern.de

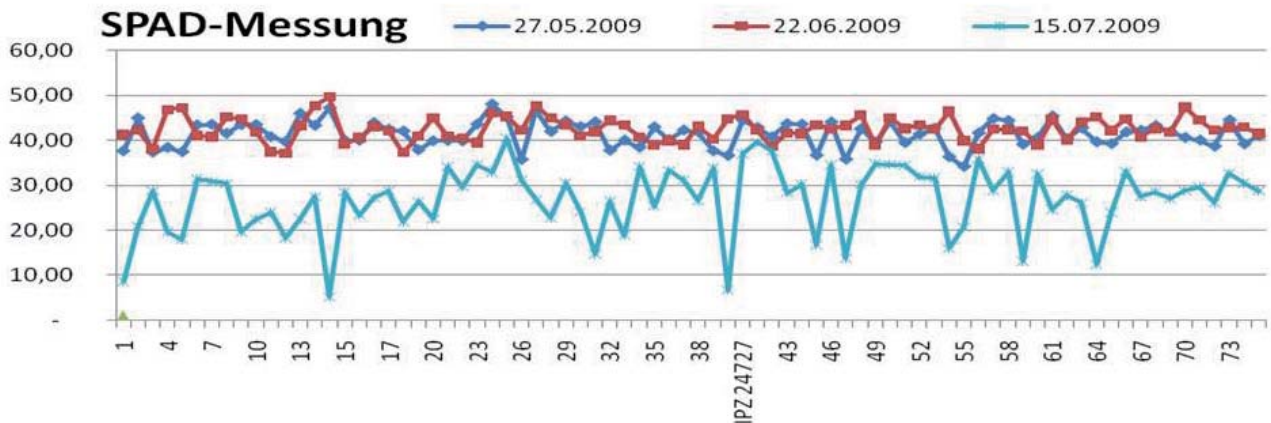


Abbildung 1: Ergebnisse der SPAD-Messung im Rain-Out-Shelter zu drei verschiedenen Zeitpunkten  
 Figure 1: SPAD measures from barley genotypes in the rain out shelter at three points of time

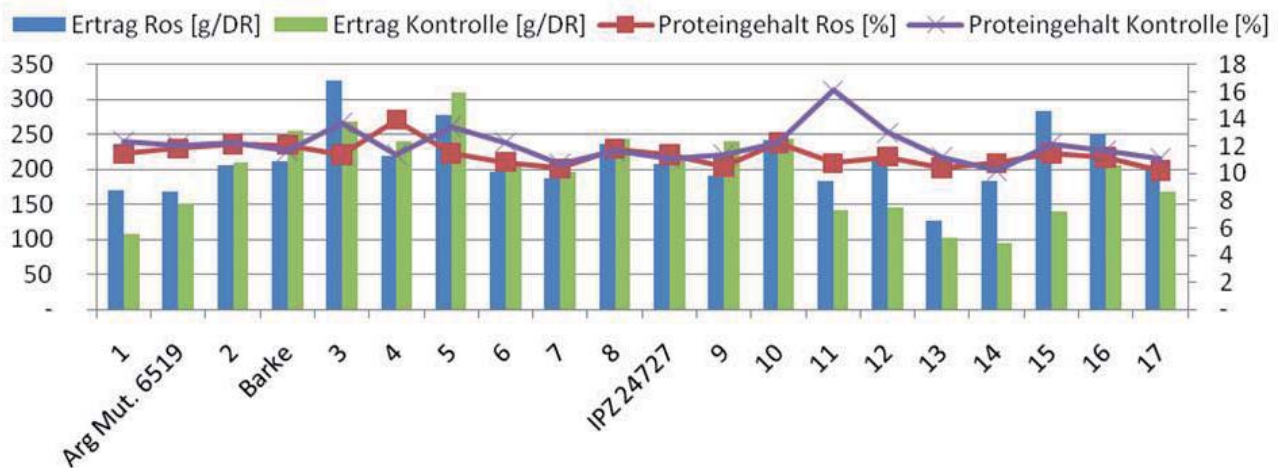


Abbildung 2: Ertrag und Proteingehalt ausgewählter Sorten im Rain-Out-Shelter (Ros) und der nicht gestressten Kontrolle  
 Figure 2: Grain yield and protein content of barley genotypes in the rain out shelter (Ros) and the control without stress

Eine genomweite Assoziationsstudie mit SNP-Markern soll Informationen über den genetischen Hintergrund der Stressresistenz liefern. Hierzu wurde das Gerstengenom mit 8-10 SNP-Markern pro Chromosom abgedeckt. Diese werden im Labor mittels eines Pyrosequenzers über alle 78 Sorten detektiert. Nach Abschluss des Projektes im Dezember 2011 sollen die gefundenen Polymorphismen in einer Assoziationsstudie mit den gesammelten phänotypischen Daten verrechnet werden um Trockenstress relevante Genorte zu identifizieren.

**Chemical desiccation**

In einem zweiten Versuch wurde eine Auswahl der Sorten chemisch behandelt, um auf diese Weise Trockenstress zu simulieren (REGAN et al. 1993). Die Pflanzen wurden nach dem Ährenschieben mit einer Kaliumjodidlösung besprüht, was zu Salzschäden und Nekrosen an den behandelten Pflanzenteilen führt (BLUM 1998). Dabei wird das Chlorophyll in den behandelten

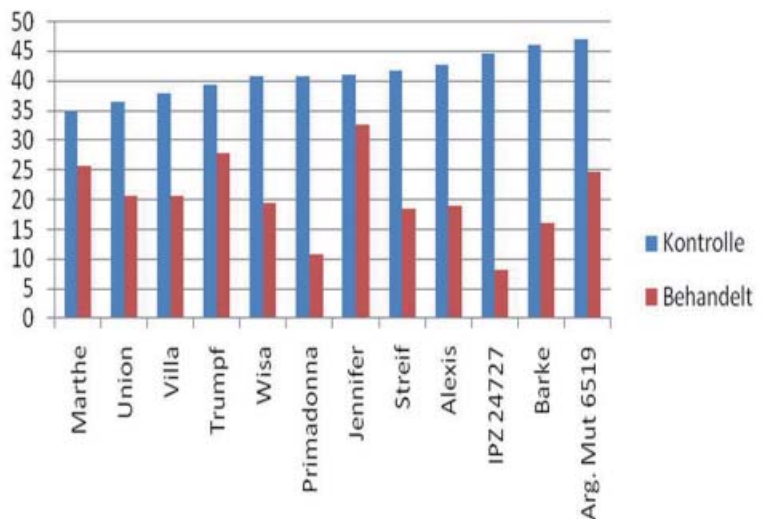


Abbildung 3: SPAD-Werte eines chemisch gestressten Versuches aus dem Jahr 2008  
 Figure 3: SPAD measures of the chemically treated trial 2008



Organen abgebaut, wodurch keine Photosynthese mehr betrieben werden kann.

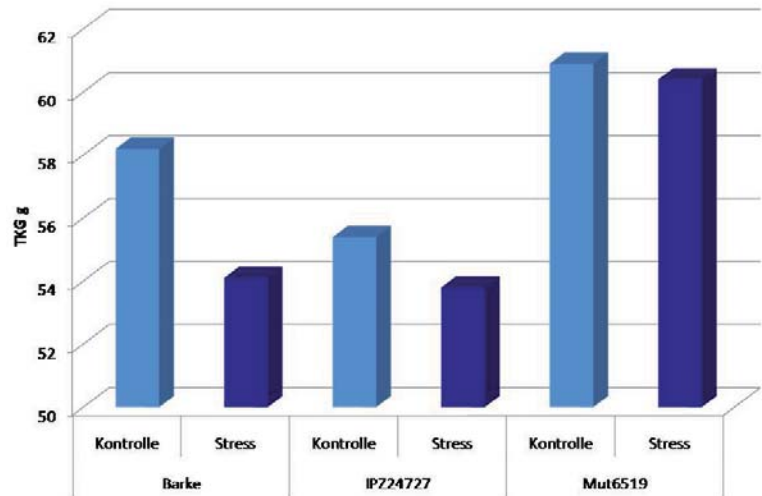
Aus *Abbildung 3* ist ersichtlich, dass die SPAD-Werte der behandelten Variante zum selben Zeitpunkt deutlich niedriger wie die Werte der Kontrolle sind und innerhalb der Genotypen stärker variieren. Ziel dieser Untersuchung ist es, die Eignung der Methode für eine schnelle Selektion im Zuchtgarten zu prüfen.

### Klimakammer

In einer Klimakammer wurden drei der Sommergersten unter den simulierten Witterungsbedingungen der Jahre 2004-2006 bis zur Abreife angebaut. Die Kontrollvariante wurde mit einer Variante unter kontrolliertem Trockenstress zum Zeitpunkt des Ährenschiebens verglichen. Die Auswirkungen der Trockenheit auf die Kornsortierung sind in *Abbildung 4* dargestellt. Ein Ziel des Versuches ist die Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in Zusammenhang mit Trockenstress (HOFMANN et al. 2010). In Abhängigkeit vom Genotyp fällt die Reduzierung des TKG unter Trockenstress unterschiedlich aus.

### Ausblick

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass alle drei Versuche eine signifikante Variabilität der Genotypen für stressrelevante Parameter zeigen. Die Simulation von Trockenstress mit verschiedenen Methoden führte zu ähnlichen Ergebnissen im Bezug auf die Messung von Ertragsparametern. Somit kann die *chemical desiccation* nach den ersten Ergebnissen als vielversprechende Selektionsmethode für den Zuchtgarten bezeichnet werden. Dies muss aber in folgenden Versuchen bestätigt werden. Weiters kann die genetische Variabilität der Genotypen für gezielte Kreuzungen zur Verbesserung der Stresstoleranz von Sommergerste genutzt werden. Zusätzlich zu den Versuchen im Rain-Out-Shelter, die 2010 und 2011 weitergeführt werden, soll die Korrelation der agronomischen Merkmale mit den Daten der Genexpressionsstudie Einblicke in die beteiligten Stoffwechselwege und die zu Grunde liegenden Gene liefern.



*Abbildung 4:* Tausendkorngewichte dreier Genotypen mit und ohne Trockenstress in der Klimakammer

*Figure 4:* Thousand grain weight of three barley genotypes grown in the climate chamber under and without drought stress

### Danksagung

Dieses Projekt wird durch das Bayerische Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (Bay. StMELF) gefördert. Die Autoren danken den fleißigen Helfern und Helferinnen der Arbeitsgruppe IPZ2b.

### Literatur

- PASSIOURA J, 2004: Increasing crop productivity when water is scarce - From breeding to field management. Proc 4<sup>th</sup> Int Crop Science Congress, New directions for a diverse planet, 26 Sep-1 Oct, Brisbane. The Regional Institute Ltd., Gosford, NSW, Australia [Available online: [http://www.cropscience.org.au/icsc2004/pdf/1018\\_passiourai.pdf](http://www.cropscience.org.au/icsc2004/pdf/1018_passiourai.pdf)].
- BLUM A, 1998: Improving grain filling under stress by stem reserve utilization. *Euphytica* 100, 77-83.
- HOFMANN K, Diethelm M, Markus Herz, Andreas Albert, Jana Barbro Winkler, Ernst D, Schmidhalter U, Wagner C, Thümmeler F, Riano-Pachon D, Kleeßen S, Lohse M, Kersten B, Schweizer G, 2010: Klimastress-Toleranz in Gerste - Identifizierung assoziierter Gene durch umfassende quantitative Expressionsanalyse. Bericht der 60. Tagung 2009 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, LFZ Raumberg-Gumpenstein, Irnding, 167-170.
- REGAN KL, WHAN BR, TURNER NC, 1993: Evaluation of chemical desiccation as a selection technique for drought resistance in a dryland wheat breeding program. *Aust J Agric Res* 44, 1683-1691.

# Sorte x Umwelt-Interaktionen von Winterweizen im biologischen Landbau

## Cultivar x site interaction of winter wheat under diverse organic farming conditions

Isabell Hildermann<sup>1\*</sup>, Monika Messmer<sup>1</sup>, Peter Kunz<sup>2</sup>, Anjana Pregitzer<sup>2</sup>,  
Thomas Boller<sup>3</sup>, Andres Wiemken<sup>3</sup> und Paul Mäder<sup>1</sup>

### Abstract

The possibilities to balance environmental conditions in organic farming systems are strongly restricted as the input of nutrients is limited and no soluble fertilisers and synthetic pesticides are used. These systems require cultivars that are able to adapt to stressful, less controlled and therefore highly variable environments. This study sums up the results of winter wheat cultivars tested under marginal and fertile soil conditions on organic farms in Switzerland. Three were derived from organic, three from conventional breeding programs and two old cultivars. Across three marginal sites, there was a slight trend towards higher yields of the organically bred cultivars. This difference was statistically significant at the lowest yielding site. However, no such trend could be observed at two fertile sites and across all five sites. Cultivars suitable for organic farming should achieve high yields but moreover high baking quality and a high nutrient use efficiency, which was in that study achieved by the organically bred cultivar Scaro.

### Keywords

Baking quality, breeding for organic farming, nutrient use efficiency, *Triticum aestivum*, yield

### Einleitung

Winterweizensorten mit Eignung für den Biolandbau müssen an sehr variable Umweltbedingungen angepasst sein. Möglichkeiten, diese Bedingungen in biologischen Anbausystemen zu kontrollieren, sind stark begrenzt, da die Nährstoffzufuhr limitiert ist und keine chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmittel und leichtlösliche mineralische Dünger eingesetzt werden. Die Zuchtziele für den Biolandbau weichen teilweise deutlich von den Zielen für den konventionellen Anbau ab. Von besonderer Bedeutung im Biolandbau sind Bestockungsvermögen, Regenerationsfähigkeit nach mechanischer Unkrautbekämpfung, rasche Nährstoffaufnahme, Unkrautunterdrückungsvermögen, Pflanzenhöhe und Resistenz oder mindestens Toleranz gegenüber Blatt- vor allem aber Ährenkrankheiten. Ein gut

ausgebildetes Wurzelsystem kann zur Nährstoffaufnahme ebenso beitragen wie eine funktionierende Symbiose mit Mikroorganismen, z.B. arbuskulärer Mykorrhiza. Nährstoffe müssen effizient aus Stängel und Blättern ins Korn verlagert werden. Die Ertragsstabilität wird oftmals stärker gewichtet als der absolute Korntrag. Hohe Anforderungen werden an die Verarbeitungsqualität, daneben aber auch an die sensorische und ernährungsphysiologische Qualität gestellt (KUNZ et al. 2006, LÖSCHENBERGER et al. 2008). Im DOK-Langzeitversuch in Therwil wurden 2007 zehn biologisch und konventionell gezüchtete Winterweizensorten in zwei bio-dynamischen und einem konventionellen System angebaut. Um ein breiteres Spektrum an Umweltbedingungen im Biolandbau abzudecken und die Sorten auf Praxisbetrieben zu testen, wurden 2008 acht der zehn Sorten auf drei bio-dynamischen Betrieben in der Schweiz angebaut. Im Vergleich zum DOK-Versuch, einem Lösstandort, waren dies sandige bis sandig-lehmige Böden und deutlich nährstoffärmer. In beiden Studien wurden Ertragskomponenten und Backqualitätsparameter untersucht und Nährstoffeffizienzen berechnet. In diesem Beitrag werden ausgewählte Ergebnisse der Versuche auf Praxisbetrieben sowie ein Vergleich aller fünf Prüfumwelten vorgestellt.

### Material und Methoden

Acht Winterweizensorten, je drei aus biologischer und konventioneller Züchtung und zwei alte Sorten (*Tabelle 1*) wurden 2008 auf drei bio-dynamischen Betrieben in Rheinau (SH), Fehraltorf (ZH) und Vielbringen-Worb (BE) getestet (*Tabelle 2*).

Bodenbearbeitung, Fruchtfolge und Düngung wurden auf den jeweiligen Betrieben praxisüblich durchgeführt. SH wurde mit insgesamt 54 kg N<sub>verfügbar</sub> unterteilt in zwei Gaben Harngülle gedüngt, BE und ZH erhielten keine Düngung. Zusätzlicher Versuchsfaktor war der Vergleich von biologischem und konventionellem vermehrtem Saatgut, der hier aber nicht behandelt wird. Die Versuche waren als randomisierte Blockanlage mit vier Feldwiederholungen aufgebaut. Aus dem Versuchsdesign ergaben sich 64 Parzellen je Standort. Die Anordnung der Sorten wurde

<sup>1</sup> Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL), Ackerstrasse, CH-5070 FRICK

<sup>2</sup> Getreidezüchtung Peter Kunz, Hof Breitlen 5, CH-8634 HOMBRECHTIKON

<sup>3</sup> Botanisches Institut, Universität Basel, Sektion Pflanzenphysiologie, Hebelstraße 1, CH-4056 BASEL

\* Ansprechpartner: Isabell HILDERMANN, isabell.hildermann@fibl.org

**Tabelle 1: Getestete Winterweizensorten mit Herkunft, Züchter, Land und Jahr der Zulassung**  
**Table 1: Tested winter wheat varieties, their origin (donor, breeder, country) and year of release**

Sorte	Donor / Züchter	Land	Zulassung
<b>Alte Sorten</b>			
Mont Calme 245	National Genbank Agroscope Changins-Wädenswil (ACW), 1260 Nyon 1	CH	1928
Probus	National Genbank Agroscope Changins-Wädenswil (ACW), 1260 Nyon 1 Agroscope Reckenholz-Tänikon (ART), 8046 Zürich	CH	1948
<b>Aus biologischer Züchtung</b>			
Scaro	Sativa Rheinau AG, 8462 Rheinau Getreidezüchtung Peter Kunz, 8634 Hombrechtikon	CH	2006
Sandomir	Getreidezüchtung Karl-Josef Müller, 29490 Neu Darchau	DE	2009
Composite Cross Population (CCP)	The Organic Research Center, Elm Farm, Hamstead Marshall, Newbury, Berkshire RG20 0HR	UK	Not registered
<b>Aus konventioneller Züchtung</b>			
Titlis	Delley Seeds and Plants, 1567 Delley Agroscope Changins-Wädenswil, 1260 Nyon 1	CH	1996
Antonius	Delley Seeds and Plants, 1567 Delley Saatzucht Donau GesmbH & CoKG, 2301 Probstdorf	AT	2003
Caphorn	Delley Seeds and Plants, 1567 Delley Monsanto UK Ltd., Cambridge, UK	FR	2001

**Tabelle 2: Standorteigenschaften der fünf Prüfumwelten**

**Table 2: Characterization of the five test environments (pre-crop, average annual temperature, average annual precipitation, soil type, clay, coarse clay, etc.)**

Standort	Vorfrucht	Temperatur (°C)	Niederschlag (mm)	Bodenart	Ton (%)	Schluff (%)	C <sub>org</sub> (%)	pH (H <sub>2</sub> O)	N <sub>min</sub> <sup>1</sup> (kg ha <sup>-1</sup> )	P <sup>2</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	K <sup>2</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )
BE	Kartoffeln	7.9	1200	Sandiger Lehm	18.4	27.0	1.6	5.0	13.1	21.9	117.3
SH	Luzerne	8.5	700	Sand mit hohem Kieselanteil	13.6	19.0	1.3	6.0	2.3	89.3	157.5
ZH	Klee gras	8.5	1300	Sandiger Lehm	25.7	33.0	2.1	6.0	17.0	32.2	160.4
BIODYN 1	Mais	9.5	785	Loess	16.0	72.0	1.2	6.1	12.9	8.7	48.3
BIODYN 2	Mais	9.5	785	Loess	16.0	72.0	1.4	6.4	16.1	13.0	68.8

<sup>1</sup> N<sub>min</sub> = NO<sub>3</sub> - N + NH<sub>4</sub> - N

<sup>2</sup> DL-Extrakt

in jeder Feldwiederholung neu randomisiert. Das Saatgut stammte aus einem bio-dynamischen (BIODYN 2) und einem konventionellen (CONMIN) Verfahren des DOK-Langzeitversuches. Saatstärke war 400 keimfähige Körner m<sup>-2</sup>. Da leichter Stinkbrandbefall (*Tilletia caries*) vorlag, wurde das Saatgut mit Tillecur (84.5% Senfpulver) behandelt. Stickstoff (N) im Stroh und im Korn wurde mittels CHN-Analyse bestimmt (Leco CHN 100, LECO Instrumente GmbH, Mönchengladbach). Die Stickstoffnutzungseffizienz (NUE) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$NUE = \frac{\text{Kornertrag (TS)}}{N_{\text{Aufnahme total}}}$$

Varianzanalysen (ANOVA) und Korrelationen wurden mit dem Softwareprogramm JMP 5.0.1. (SAS Institute Inc., Cary, NC) durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test getestet. Das Modell umfasste die Faktoren Sorte, Standort, Saatgutherkunft und Feldwiederholung und die Wechselwirkung Sorte x Standort und ein weiteres Modell die Faktoren Züchtungskategorie, Standort und die Wechselwirkung Züchtungskategorie x Standort. Um Mittelwerte zu vergleichen, wurde für signifikante Modelleffekte (P<0.05) ein Tukey-Kramer post hoc Test durchgeführt. Für jeden Parameter wurde die ANOVA zuerst für alle drei Standorte zusammen, anschließend für jeden Standort separat berechnet. Korrelationen wurden mit

dem Spearman Rang-Koeffizienten ermittelt. Der Vergleich der Ergebnisse der Praxisversuche mit den Ergebnissen aus den bio-dynamischen Verfahren (BIODYN 1 und BIODYN 2) im DOK-Versuch wurde mit der Software PLABSTAT durchgeführt (UTZ 2005). Für ausgewählte Parameter wurde zusätzlich zur ANOVA die Stabilität dieses Parameters über alle Prüfumwelten entsprechend der Ökivalenz nach WRICKE (1962) berechnet.

## Ergebnisse und Diskussion

### Kornertrag und Gluten Index

Standorte und Sorten hatten einen signifikanten Effekt auf den Kornertrag. Außerdem traten signifikante Wechselwirkungen zwischen Sorte und Standort auf. Über alle Sorten gemittelt war der Ertrag am ungedüngten Standort BE mit 2.2 t ha<sup>-1</sup> am niedrigsten, in SH und ZH lag der Kornertrag bei 2.6 und 2.8 t ha<sup>-1</sup>. In SH und ZH konnte durch die zuvor angebauten Leguminosen Stickstoff nachgeliefert und dadurch eine Ertragssteigerung ermöglicht werden. Trotz der Güllendüngung in SH waren die Erträge in ZH höher, da dies der etwas fruchtbarere Standort ist. Der C<sub>org</sub>-Gehalt ist hier signifikant höher als am sandigen, flachgründigen Standort SH. Insgesamt waren die Erträge der acht Sorten auf den Praxisbetrieben deutlich geringer als die nährstoffreicheren Bedingungen im DOK-Versuch (HILDERMANN et al. 2009).

Über alle drei Standorte gemittelt, unterschieden sich die Erträge zwischen den Sorten nur geringfügig. Wurden die Sortenunterschiede für jeden der drei Standorte separat geprüft, so gab es keine signifikanten Unterschiede in ZH, hingegen zeigte sich eine deutlichere Sortendifferenzierung an den Standorten SH und BE. In BE und SH erzielten die Biosorten Sandomir, Scaro und CCP die höchsten Erträge. Wurde eine ANOVA nach den Züchtungskategorien durchgeführt, so erreichten die Biosorten unter den nährstoffärmeren Bedingungen der Praxisbetriebe leicht höhere Erträge als die konventionellen und alten Sorten. Gesichert signifikant war dies in BE, dem Standort mit den geringsten Erträgen. Hier war der durchschnittliche Ertrag der Biosorten um 14 % höher als der der konventionellen Sorten. Dies ist in Übereinstimmung mit MURPHY et al. (2007), die zeigten, dass direkte Selektion von Winterweizensorten unter marginalen Bedingungen besonders effizient war. Im nährstoffreicheren DOK-Versuch und auch über alle fünf Standorte gemittelt waren jedoch die konventionellen Sorten (Caphorn und Antonius) ertragsstärker. Mittlerweile gibt es viele Hinweise, dass Sorten, die unter ökologischen Anbaubedingungen maximale Erträge bringen sollen auch direkt unter Biobedingungen selektiert werden sollten (KUNZ et al. 2006, LÖSCHENBERGER et al. 2008). Kürzlich veröffentlichte Studien zu Winterweizen (MURPHY et al. 2007) und Sommerweizen (REID et al. 2009) belegen, dass Sorten aus direkter Selektion unter Biobedingungen höhere Erträge erzielten. BURGER et al. (2008) konnten signifikante Wechselwirkungen zwischen Sorten und Anbausystemen bei Mais nachweisen, die daher eine direkte Selektion unter den jeweiligen Zielbedingungen vorschlagen.

Kornertrag und  $\text{Gluten}_{\text{total}}$  stiegen mit zunehmendem Nährstoffangebot an. Sorte x Umwelt-Interaktionen waren für den Gluten-Index (GI) signifikant. Unabhängig vom Nährstoffangebot war der GI der Sorten Scaro, Antonius und Caphorn über alle Standorte stabil, während die Sorten Sandomir, CCP und Titlis bei vergleichsweise höherem Stickstoffangebot (BE, ZH, BIODYN 2) einen niedrigen GI hatten.

### Nährstoffnutzungseffizienz

Der Kornertrag war signifikant positiv korreliert mit dem Korn-N-Ertrag ( $r = 0.93$ ) und NUtE ( $r = 0.72$ ). Sorte x Umwelt-Interaktionen waren für den Korn-N-Ertrag nicht, für NUtE hingegen deutlich signifikant ( $P < 0.01$ ). Im Gegensatz zu den konventionellen Sorten, die stark auf die Umwelten reagierten und vor allem bei geringem Nährstoffangebot eine niedrige NUtE hatten, war die NUtE der Biosorten und der alten Sorten über alle Prüfumwelten stabiler. Dies galt für die Biosorten Scaro und Sandomir und die alte Sorte Mont Calme 245.

### Schlussfolgerungen

Sorten aus Biozüchtung realisierten an marginalen Bio-Standorten leicht höhere Erträge als Sorten aus konventioneller Züchtung, nicht jedoch an nährstoffreicheren Standorten. Für den Bioanbau geeignete Sortentypen sollten auch unter nährstoffarmen Bedingungen hohe Erträge, eine gute Backqualität und eine hohe Nährstoffnutzungseffizienz haben. Unter den hier geprüften Umweltbedingungen zeigte die Biosorte Scaro eine gute Kombination dieser Eigenschaften.

### Danksagung

Diese Studien wurden finanziell unterstützt von der Software AG Stiftung, der Wolfermann-Nägeli Stiftung, der Evidenz Stiftung, der Stiftung für Mensch-Mitwelt und Erde und FP 7 NUE-CROPS. Herzlichen Dank für Feld- und Laborarbeiten an das Team Getreidezüchtung Peter Kunz sowie an Röbi Frei und Antje Stotz (FiBL).

### Literatur

- BURGER H, SCHLOEN M, SCHMIDT W, GEIGER H, 2008: Quantitative genetic studies on breeding maize for adaptation to organic farming. *Euphytica* 163, 501-510.
- HILDERMANN I, THOMMEN A, DUBOIS D, BOLLER T, WIEMKEN A, MÄDER P, 2009: Yield and baking quality of winter wheat cultivars in different farming systems of the DOK long-term trial. *J Sci Food Agric* 89, 2477-2491.
- KUNZ P, BECKER K, BUCHMANN M, CUENDET C, MÜLLER J, MÜLLER U, 2006: Bio-Getreidezüchtung in der Schweiz. Tagungsband 2. Österreichische Fachtagung für biologische Landwirtschaft, 21.-22. März, Gumpenstein, 31-35. HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Irdning.
- LÖSCHENBERGER F, FLECK A, GRAUSGRUBER H, HETZENDORFER H, HOF G, LAFFERTY J, MARN M, NEUMAYER A, PFAFFINGER G, BIRSCHITZKY J, 2008: Breeding for organic agriculture: the example of winter wheat in Austria. *Euphytica* 163, 469-480.
- MURPHY KM, CAMPBELL KG, LYON SR, JONES SS, 2007: Evidence of varietal adaptation to organic farming systems. *Field Crops Res* 102, 172-177.
- REID T, YANG RC, SALMON D, SPANER D, 2009: Should spring wheat breeding for organically managed systems be conducted on organically managed land? *Euphytica* 169, 239-252.
- UTZ HF, 2005: PLABSTAT. A computer program for statistical analysis of plant breeding experiments. Institute of Breeding, Seed Science, and Population Genetics, University Hohenheim, Stuttgart. [Available online: <https://www.uni-hohenheim.de/plantbreeding/software/>; accessed 23 Oct 2009]
- WRICKE G, 1962: Über eine Methode zur Erfassung der ökologischen Streubreite in Feldversuchen. *Z Pflanzenzüchtg* 47, 92-96.

# Klimastress-Toleranz in Gerste - Identifizierung assoziierter Gene durch umfassende quantitative Expressionsanalyse

## Climatic stress tolerance in barley - Identification of associated genes by comprehensive quantitative expression analysis

Kerstin Hofmann<sup>1</sup>, Manuela Diethelm<sup>1</sup>, Markus Herz<sup>2</sup>, Andreas Albert<sup>3</sup>, Jana Barbro Winkler<sup>3</sup>,  
Dietrich Ernst<sup>3</sup>, Urs Schmidhalter<sup>4</sup>, Carola Wagner<sup>5</sup>, Fritz Thümmel<sup>6</sup>, Diego Riano-Pachon<sup>7</sup>,  
Sabrina Kleeßen<sup>7</sup>, Marc Lohse<sup>7</sup>, Birgit Kersten<sup>7</sup> und Günther Schweizer<sup>1\*</sup>

### Abstract

As the first consequences of the climatic change can be observed by now, the demand for barley varieties tolerant to abiotic stress will soon increase. But as these tolerances are usually of a quantitative nature, it is essential to find the genes involved and to understand the function of these genes, before trying to breed for effective and enduring tolerance. For this purpose three genotypes differing in tolerance to drought stress were submitted to an experiment in the exposition chambers at the Helmholtz Center in Munich. In this experiment the plants were submitted to drought stress and/or increased UV radiation. Samples for RNA extraction were taken at ten dates throughout the experiment. Four of those sampling dates covering the whole drought stress period were chosen for a transcriptome analysis with a 44k Agilent Microarray and a 454 sequencing assay. The resulting data is currently being analyzed at the Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology in Golm. The expression data will be visualized on barley signaling pathways using the MapMan tool. Thereby candidate genes related to drought stress will be identified. Those candidate genes will be validated with Real-Time PCR and correlated with the phenotypic data from the experiment.

### Keywords

Climatic stress, drought stress, *Hordeum vulgare*, transcriptome analysis, UV stress

### Einleitung

Die ersten Auswirkungen des Klimawandels sind bereits zu spüren. Die Nachfrage nach Sorten, die gegenüber abiotischem Stress tolerant sind, dürfte daher stark ansteigen.

Da diese Toleranzen aber meist quantitativ bedingt sind (CATTIVELLI et al. 2008), ist es essentiell, zunächst die beteiligten Gene zu identifizieren und ihren Einfluss auf Funktion und Sorte zu verstehen. Ziel dieses Projektes ist es, über eine umfassende vergleichende Transkriptomanalyse solche Gene zu identifizieren und ihre Rolle bezüglich Trockenstress-Toleranz weiter aufzuklären.

### Material und Methoden

Das Experiment wurde in den Expositionskammern des Helmholtz Zentrums in Neuherberg, München, durchgeführt. Drei zweizeilige Sommergersten-Genotypen wurden auf ihre Toleranz gegenüber Trocken- und UV-Stress untersucht: Barke, eine deutsche Braugerstensorte, Mut6519, eine Akzession aus Argentinien, die durch gute Toleranz gegenüber Trockenstress aufgefallen ist und IPZ24727, ein Zuchtstamm des Institutes für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft.

Die drei Genotypen wurden in speziellen Röhren parallel in vier Expositionskammern angebaut. Je Röhre wurden vier Pflanzen ausgesät. Die Pflanzen in der linken Kammerhälfte wurden während des ganzen Versuches durchgehend bewässert, während die Pflanzen in der rechten Kammerhälfte einer Trockenperiode von 12 Tagen ausgesetzt wurden, beginnend jeweils im Entwicklungsstadium BBCH 59 (Ende Ährenschieben).

In zwei der Kammern wurde die UV-Strahlung auf normalem Level gehalten, in den anderen beiden Kammern waren die Pflanzen einer deutlich erhöhten UV-Strahlung ausgesetzt. Das simulierte Wetter in den Kammern entsprach dem Durchschnitt der Jahre 2004-2006, beginnend Anfang April und endend Mitte August. Proben wurden zu zehn Zeitpunkten über die gesamte Dauer des Experimentes genommen. Die Zeitpunkte wurden abhängig vom Entwicklungsstadium

<sup>1</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung 1b, Am Gereuth 2, D-85354 FREISING

<sup>2</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung 2b, Am Gereuth 6, D-85354 FREISING

<sup>3</sup> Helmholtz Zentrum München, Abteilung Experimentelle Umweltsimulation (EUS), Ingolstädter Landstraße 1, D-85764 NEUHERBERG

<sup>4</sup> Department für Pflanzenwissenschaften, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, TU München, Emil-Ramann-Straße 2, D-85350 FREISING

<sup>5</sup> IMG M Laboratories GmbH, Lochhamer Straße 29, D-82152 MARTINSRIED

<sup>6</sup> vertis Biotechnologie AG, Lise-Meitner-Straße 30, D-85354 FREISING

<sup>7</sup> Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Bioinformatik, Am Mühlenberg 1, D-14424 POTSDAM-GOLM

\* Ansprechpartner: Dr. Günther Schweizer, guenther.schweizer@lfl.bayern.de

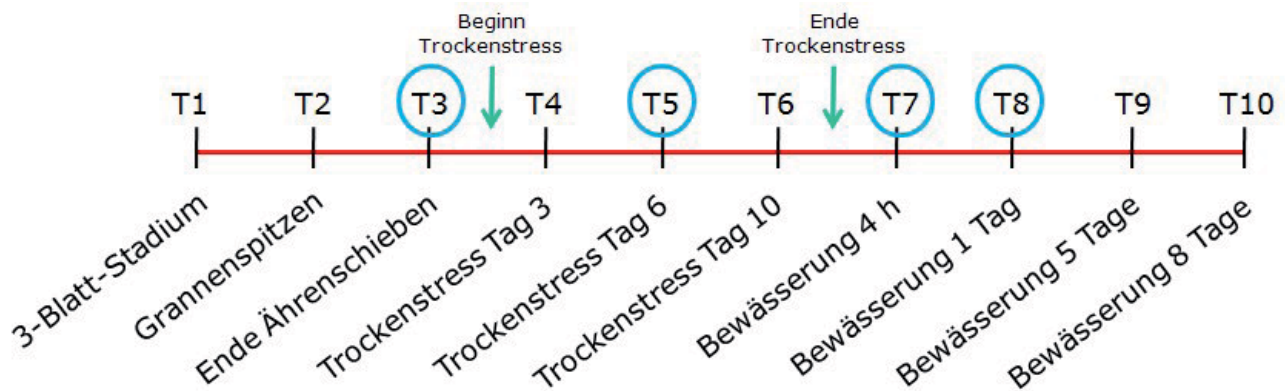


Abbildung 1: Übersicht über die Probenahmezeitpunkte, bezogen auf Entwicklungsstadium und Trockenstressperiode. Die eingekreisten Zeitpunkte wurden für die Gesamt-Transkriptomanalyse verwendet. Beginn und Ende der zwölf-tägigen Trockenstressperiode sind angegeben

Figure 1: Overview about sampling dates referring to developmental stage and drought stress period. Circled sampling dates have been used for the transcriptome analysis. Beginning and end of the drought stress period are indicated.

und der Trockenstressperiode gewählt (Abbildung 1). Jeweils das zweitjüngste Blatt (F-1) von vier Bestockungstrieben wurde abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für jeden Beprobungszeitpunkt wurde eine andere Pflanze gewählt.

Um vielversprechende Kandidatengene für weitere Untersuchungen zu identifizieren, wurde zunächst eine Gesamt-Transkriptomanalyse zu ausgewählten Zeitpunkten durchgeführt. Dies geschah parallel mit einem 44k Agilent Microarray (Agilent 2010), und einer 454-Sequenzierung (MARGULIES et al. 2005, WICKER et al. 2006, EMRICH et al 2007), bei welcher alle Gene, die zum Zeitpunkt x in der Pflanze exprimiert sind, quantitativ erfasst werden können. Die bioinformatische Auswertung wird in Zusammenarbeit mit dem MPI für molekulare Pflanzenphysiologie in Golm durchgeführt.

## Ergebnisse

Vor der eigentlichen Auswertung der Daten wurden diese zunächst auf ihre Qualität und Integrität geprüft. So wurde beispielsweise eine Hauptkomponentenanalyse (RINGNER 2008) basierend auf den Transkript-Expressionswerten der Proben aus dem Microarray-Experiment durchgeführt (Abbildung 2). Wie erwartet zeigten sich zwei eng beisammen liegende Cluster für die Genotypen Barke und IPZ24727 (Lfl), während das Cluster von Mut6519 deutlich abgegrenzt ist. Dies lässt auf eine saubere Verarbeitung der Proben sowie eine hohe Qualität der Expressionsdaten schließen.

Im nächsten Schritt wurden alle Gene ermittelt, welche im Vergleich Trockenstress-Kontrolle differentiell exprimiert sind. Abbildung 3 gibt beispielhaft am Zeitpunkt T5 die Anzahl der jeweils regulierten Gene des Microarray-Experimentes wieder. Die linke Seite der Abbildung gibt die Anzahl der Gene mit erhöhter Expression an, die rechte Seite die der Gene mit verminderter Expression.

Auch die Daten der 454-Sequenzierung zeichnen sich durch ihre sehr gute Qualität aus. So konnten je Zeitpunkt und Genotyp ca. 40-50.000 Gentranskripte erfasst und zu Contigs mit einer durchschnittlichen Länge von 850 bp zu-

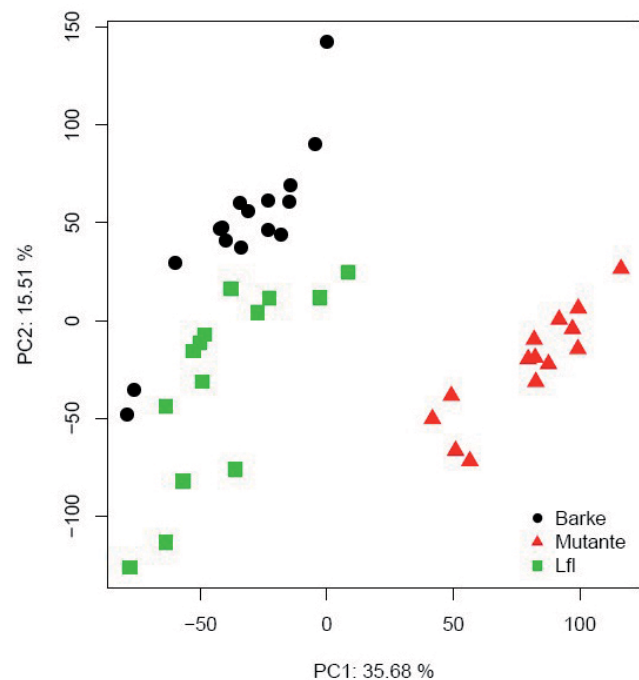


Abbildung 2: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Transkript-Expressionswerte der drei Genotypen. Zur Analyse wurden die normalisierten Signalstärken des Agilent Microarray-Experimentes verwendet. Die Standard-Hauptkomponentenanalyse wurde mit der Statistik-Software R durchgeführt. Die drei ausgewählten Genotypen lassen sich anhand ihres Expressionsmusters deutlich differenzieren.

Figure 2: Principal component analysis (PCA) of transcript expression values of the 3 genotypes. Normalised signal intensities measured in the Agilent array experiments were used for the analysis. A standard principal component (PC) analysis was performed using the R software package for statistical computation. The three genotypes can easily be differentiated by their expression values.

sammengefasst werden, was etwa der Anzahl der zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle aktiven Gene entspricht. Es ist daher davon auszugehen, dass das Transkriptom einfach abgedeckt wurde.

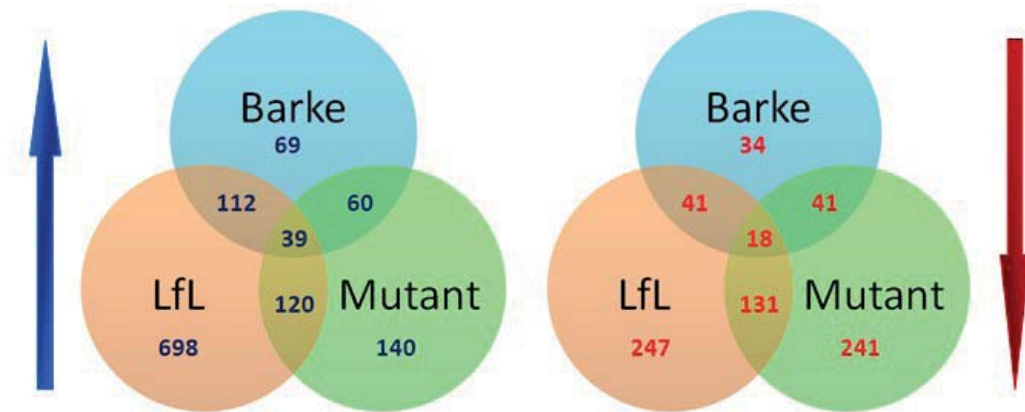


Abbildung 3: Anzahl der Gene, die in den drei Genotypen im Vergleich T5 Trockenstress - T5 Kontrolle spezifisch oder gemeinsam reguliert sind (links hochreguliert, rechts herunterreguliert).

Figure 3: Number of genes which are regulated in one or more of the three genotypes comparing T5 drought stress and T5 control (left upregulated, right downregulated).

## Ausblick

Zurzeit werden die Expressionsdaten beider Ansätze über unterschiedliche Softwareansätze, z.B. MapMan (USADEL et al. 2005) integriert. Darüber sollen die Stoffwechselwege identifiziert werden, welche bei Trockenstress signifikante Aktivitätsunterschiede aufweisen (SREENIVASULU et al. 2008). Desweiteren wurden im Forschungsverbund von den beteiligten Arbeitsgruppen regelmäßig stressrelevante physiologische Parameter erhoben, sowie nach der Ernte Qualitäts- und Ertragsdaten. In einem weiteren Schritt werden die Gen-Expressionsdaten mit diesen erhobenen Daten korreliert. Mittels dieser beiden Ansätze sollen diejenigen Gene identifiziert werden, welche für eine Toleranz gegenüber Trockenstress eine Schlüsselrolle spielen. Diese Gene sollen mittels Real-Time PCR über alle beprobten Zeitpunkte validiert und auf ihre Nutzbarkeit für die praktische Pflanzenzüchtung untersucht werden.

## Literatur

- AGILENT, 2010: Microarray specifications - Barley gene expression [Available online: <http://www.chem.agilent.com/en-US/Products/Instruments/dnamicomicroarrays/barleyoligomicroarraykit/Pages/Barley-oligospecifications.aspx>; accessed 19 Jan 2010].
- CATTIVELLI L, RIZZA F, BADECK FW, MAZZUCOTELLI E, MASTRANGELO AM, FRANCIA E, MARE 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.
- EMRICH SJ, BARBAZUK B, Li L, SCHNABLE P, 2007: Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Res* 17, 69-73.
- MARGULIES M, EGHOLM M, ALTMAN WE, ATTIYA S, BADER JS, BEMBEN LA, BERKA J, BRAVERMAN MS, CHEN YJ, CHEN Z, DEWELL SB, DU L, FIERRO JM, GOMES XV, GODWIN BC, HE W, HELGESEN S, HO CH, IRZYK GP, JANDO SC, ALENQUER MLI, JARVIE TP, JIRAGE KB, KIM JB, KNIGHT JR, LANZA JR, LEAMON JH, LEFKOWITZ SM, LEI M, LI J, LOHMAN KL, LU H, MAKHIJANI VB, MCDADE KE, MCKENNA MP, MYERS EW, NICKERSON E, NOBILE JR, PLANT R, PUC BP, RONAN MT, ROTH GT, SARKIS GJ, SIMONS JF, SIMPSON JW, SRINIVASAN M, TARTARO KR, TOMASZA, VOGT KA, VOLKMER GA, WANG SH, WANG Y, WEINER MP, YU P, BEGLEY RF, ROTHBERGET JM, 2005: Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. *Nature* 437, 376-380.
- RINGNÉR M, 2008: What is principal component analysis. *Nature Biotechnology* 26, 303-304.
- SREENIVASULU N, USADEL B, WINTER A, RADCHUK V, SCHOLZ U, STEIN N, WESCHKE W, STRICKERT M, CLOSE TJ, STITT M, GRANER A, WOBUS U, 2008: Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiol* 146, 1738-1758.
- USADEL B, NAGEL A, THIMM O, REDESTIG H, BLAESING OE, PALACIOS-ROJAS N, SELBIG J, HANNEMANN J, PIQUES MC, STEINHAUSER D, SCHEIBLE WR, GIBON Y, MORCUENDE R, WEICHT D, MEYER S, STITT M, 2005: Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiol* 138, 1195-1204.
- WICKER T, SCHLAGENHAUF E, GRANER A, CLOSE TJ, KELLER B, STEIN N, 2006: Sequencing put to test using the complex genome of barley. *BMC Genomics* 7: 275. DOI 10.1186/1471-2164-7-275.

# Brassica-Wildarten als neue genetische Ressource für die Rapszüchtung Wild species of *Brassica* as a new genetic resource for rapeseed breeding

Tobias Jesske<sup>1</sup>\*, Birgit Olberg, Heiko C. Becker

## Abstract

Rapeseed (*Brassica napus*) is a relatively young crop, with larger breeding programs only since few decades. For this reason, rapeseed shows a comparatively low genetic diversity in its gene pool. During its evolution rapeseed developed by a spontaneous hybridization between turnip rape (*B. rapa*, A genome) and cabbage (*B. oleracea*, C genome). This can be used to produce artificial crosses between the parental species to establish new 'resynthesized' rapeseed lines. For the production of resynthesized rapeseed on the cabbage side normally vegetable types were used as parental lines. But there are in *B. oleracea* as well as in many related species wild forms whose breeding potential is so far largely unused. The objective of this study is to enlarge the genetic diversity in rapeseed breeding by using for the first time *Brassica* wild types and wild species for the production of resynthesized rapeseed lines. Seeds from 42 resynthesized lines are currently present for further experiments, which are shortly described.

## Keywords

Broadening genetic diversity, gene pool, resynthesized rapeseed, self incompatibility, wild species, yellow sarson

## Einleitung

Raps (*Brassica napus*) ist eine verhältnismäßig junge Kulturpflanze, die erst seit wenigen Jahrzehnten intensiv züchterisch bearbeitet wird. Aus diesem Grund findet sich im Rapsenpool nur eine vergleichsweise geringe genetische Diversität. Da Raps eine amphidiploide Spezies ist, die evolutionär durch eine spontane Hybridisierung zwischen Rübsen (*B. rapa*, A Genom) und Kohl (*B. oleracea*, C Genom) entstanden ist, lassen sich durch Kreuzung der beiden Ursprungseltern neue „resynthetisierte“ Rapsformen herstellen. Für die Erstellung von Resyntheseraps wurden bisher als *B. oleracea* Eltern fast ausschließlich Gemüseformen verwendet. Es gibt aber sowohl bei *B. oleracea* wie auch bei verwandten Arten sehr viele Wildformen deren züchterisches Potential bisher weitgehend ungenutzt ist. Ziel des Projektes ist es daher, diese genetischen Ressourcen erstmals für die Rapszüchtung verfügbar zu machen und somit den vorhandenen Genpool zu erweitern.

## Material und Methoden

Es wurden Kreuzungen von *B. rapa* ssp. *trilocularis* 'Yellow Sarson' bzw. *B. rapa* ssp. *oleifera* 'Largo' mit verschiedenen, das C Genom tragenden, Wildkohllarten durchgeführt. Die Embryonen wurden 14 Tage später auf Nährmedium überführt und weiter kultiviert. Die aus den Embryonen erhaltenen Pflanzen wurden in vitro vermehrt, später colchiziniert und anschließend in Erde gepflanzt. Im Gewächshaus wurden die Pflanzen zur Blüte gebracht und mittels Knospenbestäubung geselbstet.

## Ergebnisse

Zu Beginn des Projektes standen insgesamt 47 Resynthese-Linien, die aus Kreuzungen mit elf verschiedenen *Brassica* Wildarten hervorgegangen sind, zur Verfügung. Größtenteils lagen sie zu diesem Zeitpunkt als haploide in vitro Kulturen vor. Die Diploidisierung der Pflanzen mittels Colchiziniierung gestaltete sich bei vielen der „Wild“-Resynthesen schwierig (Abbildung 1), zusätzlich kam bei einigen der Resynthesen eine hochgradige Selbstinkompatibilität hinzu. Ungeachtet dessen gelang es, von den meisten der Wild-Resynthesen Saatgut zu erhalten, so dass zum jetzigen Zeitpunkt von 42 Linien Saatgut zur weiteren Vermehrung und für Versuchszwecke zur Verfügung steht (Tabelle 1).

Tabelle 1: Anzahl vorhandener Resynthesen je Wildart, von denen Saatgut gewonnen werden konnte

Table 1: Number of resynthesized rapeseed lines with wild *Brassica* species from which seeds were produced

Wildkohllart	Rübsen ( <i>Brassica rapa</i> )	
	Yellow Sarson	Largo
<i>Brassica bourgeauii</i>	1	
<i>Brassica cretica</i>	3	1
<i>Brassica incana</i>	7	3
<i>Brassica insularis</i>	3	1
<i>Brassica hilarionis</i>	2	1
<i>Brassica macrocarpa</i>	1	
<i>Brassica montana</i>	7	4
<i>Brassica oleracea</i>	4	1
<i>Brassica rupestris</i>	1	
<i>Brassica taurica</i>	1	
<i>Brassica villosa</i>		1
Summe	30	12

<sup>1</sup> Georg-August-Universität, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Von-Siebold-Straße 8, D-37075 GÖTTINGEN

\* Ansprechpartner: Tobias JESSKE, tjesske@agr.uni-goettingen.de





**Abbildung 1: Zwei Blütenstände der selben „Wild“-Resynthese nach partiell erfolgreicher Colchizinierung. Links große fertile Blüten, rechts kleine sterile und haploide Blüten**

**Figure 1: Two inflorescences of the same ‘resynthesized’ rapeseed line with wild *Brassica* after partially successful colchicine treatment. Big fertile flowers (left) and small, sterile and haploid flowers (right)**

Dabei entstammen 30 Genotypen aus Kreuzungen mit dem Rübsen Yellow Sarson, einer Sommerform, und weitere 12 wurden durch Kreuzungen mit dem Winterrübsen Largo hergestellt.

### Ausblick

Da zu erwarten ist, dass sich die mit den Wildarten erstellten Resynthesen genetisch stark von angepasstem Zuchtmaterial unterscheiden, werden derzeit AFLP Markeranalysen zur Bestimmung der genetischen Distanz der Wild-Resynthesen im Vergleich mit herkömmlichen Resynthesen und einer Reihe unterschiedlicher Rapsorten (z.B. Winter-, Sommer- und Futterrapsorten, exotische Rapsorten, Kohlrüben) durchgeführt. Weiterhin wurde zur Aussaat 2009 ein Beobachtungsanbau der Resynthesen an 8 Standorten angelegt. Außerdem wurden Testkreuzungen der Resynthesen mit 2 männlich sterilen Winterrapslinien erstellt, die ebenfalls an 8 Standorten angebaut werden. Nach der Ernte der Versuche werden umfassende Qualitätsanalysen des Saatgutes mittels NIRS, GC und HPLC durchgeführt werden (u.a. Ölgehalt, Fettsäuren, Sinapoylverbindungen, Phytosterole).

### Danksagung

Die Durchführung des Projektes findet in Kooperation mit den Rapszüchtern der GFP statt. Die Finanzierung wurde vom BMELV übernommen.

# Selection for cold hardiness and late bolting for breeding winter beets

Martin Kirchhoff, Conny Tränkner, Friedrich Kopisch-Obuch and Christian Jung<sup>1\*</sup>

## Abstract

The yield of a regular spring sown sugar beet is limited by insufficient canopy in May and June. An autumn sown sugar beet ('winter beet') with early canopy closure is expected to have a yield increase of up to 26%. Winter hardiness and a system for bolting control are essential requirements for the breeding of winter beets. Therefore, we are evaluating the genetic variation for winter-hardiness and bolting behaviour within the *B. vulgaris* gene pool under field conditions. Furthermore, we will map QTLs for winter-hardiness and bolting behaviour and we will establish a system for bolting control by targeted suppression and expression of flowering time genes from sugar beet and *Arabidopsis thaliana*. This paper presents preliminary results for the genetic variation of winter-hardiness and bolting behaviour of 396 *Beta vulgaris* accessions and a concept for bolting control of beets.

## Keywords

*Beta vulgaris*, bolting control, flowering genes, sugar beet, winter-hardiness

## Introduction

The yield of spring sown sugar beet (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* L.) beet is mainly restricted by limited light interception due to insufficient canopy in May and June when sun radiation already reaches high levels before canopy closure in July (JAGGARD and WERKER 1999). One strategy to overcome this asynchrony is an autumn sown beet whose leaf canopy has been developed early in spring and thus can optimally intercept high radiation levels in May and June. To grow an autumn sown sugar beet, however, two requirements have to be fulfilled: I) sufficient winter hardiness to survive the Central European winters and II) control of bolting and flowering, as the low winter temperatures will induce plant vernalization that promotes bolting of sugar beets in spring. Bolting and flowering are not desired during crop cultivation as this causes major beet and sugar yield losses. However, non-bolting plants are unable to flower and to produce seeds. Thus, it is necessary to establish a system for bolting control.

## Material and Methods

To evaluate the genetic variation for winter-hardiness and bolting behavior under Central and Eastern European conditions, a representative set of 396 *B. vulgaris* accessions,

including 278 members of the *Beta* core collection (FRESE 2000), was tested at four locations in two replications in two years, 2008/09 and 2009/10. The locations were Minsk and Nesvizh (Belarus) and Kiel and Dransfeld (Germany). The tested panel comprises 100 sugar beets, 90 red table beets, 62 leaf beets, 61 fodder beets, 56 wild beets and 27 accessions with unknown background. In 2008, the experiment was sown in August in a randomized complete block design in 2.1 m long single rows with a row distance of 45 cm. Each row contained 15 plants of one accession. The survival rates (SR) of the plants were determined as the ratio of living plants after and before winter. To identify late bolting accessions within the panel, the bolting behaviour of surviving plants was monitored. Accessions with at least one plant bolting before the 6<sup>th</sup> May were classified as early bolters. A second class includes accessions which started to bolt between the 6<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> May. Accessions starting to bolt between the 18<sup>th</sup> May and the 7<sup>th</sup> June were classified as late bolting. The accessions bolting later than the 7<sup>th</sup> June were encompassed as the latest bolting class.

## Results and Discussion

### *Selection for cold hardiness and late bolting*

Winter conditions in 2008/09 differed among the test locations with temperatures ranging from -12°C in Kiel to -24°C in Göttingen. The proportion of accessions with at least one plant surviving ranged from 33% in Minsk to 89% in Kiel, with Göttingen showing the best differentiation within the 396 tested accessions. Therefore, further focus is given only on data of this environment. In Göttingen, SR for the tested accessions ranged from 0 to 100%, indicating polygenic inheritance of winter hardiness (Figure 1). Sugar beet is by far the most winter hardy cultivated form within the *B. vulgaris* gene pool. Of the tested sugar beets about 90% had SR higher than 90%. The lowest SR of all sugar beet accession was 58%.

Our results indicate sufficient genetic variation in the *B. vulgaris* gene pool for improving winter hardiness in sugar beet. For further improvement of winter hardiness in sugar beet, tolerant sugar beet accessions were crossed to each other. Also, crosses between susceptible and tolerant sugar beet accessions were performed for the development of mapping populations for the genetic dissection of winter hardiness. Identification of QTLs responsible for winter hardiness might offer the opportunity for winter independent selection via marker assisted selection.

<sup>1</sup> Plant Breeding Institute, Christian-Albrechts-University of Kiel, Olshausenstraße 40, D-24098 KIEL

\* Ansprechpartner: Prof. Dr. Christian JUNG, c.jung@plantbreeding.uni-kiel.de

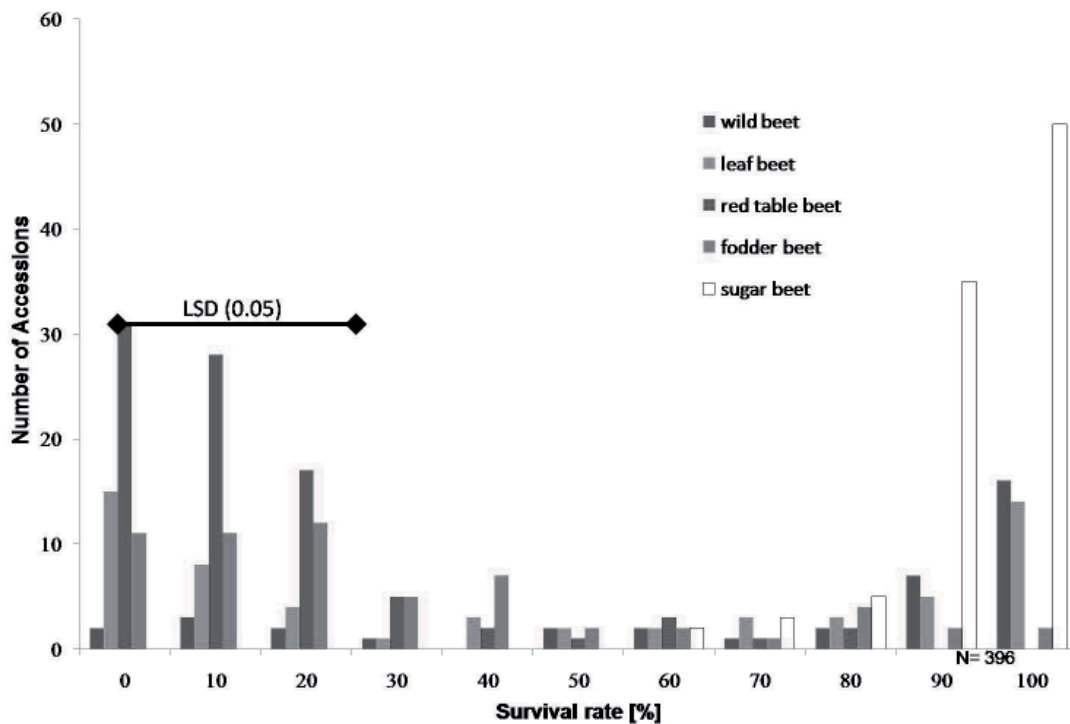


Figure 1: Histogram of survival rates of 396 *Beta vulgaris* accessions after winter in Göttingen 2008/09. The survival rate is the ratio of plants after and before winter

The panel of *B. vulgaris* accessions showed a variation in bolting time of more than a month, including early accessions bolting before the 6<sup>th</sup> of May to the latest bolting accessions which bolted after the 7<sup>th</sup> of June. Before the 6<sup>th</sup> of May about two thirds of the accessions started bolting. Comparing the different *B. vulgaris* types, Sugar beet accessions were among the earliest whereas leaf beets were among the latest bolting accessions. Of the sugar beet accessions 87% bolted earlier than the 6<sup>th</sup> of May. In contrast only 39% of the leaf beets were bolting at that date, whereas 30% of the leaf beets were bolting after the 18<sup>th</sup> of May. Therewith the leaf beets showed the widest variation for bolting time. Within the panel sugar beet displayed relatively low variation for bolting as only five percent were bolting later than the 18<sup>th</sup> of May.

Genotypes that do not bolt after winter are essential for the development of winter beets. As expected, there was no accession with complete bolting inhibition, however a large variation in bolting behaviour was observed. Early bolting of the majority of the sugar beet accessions can be explained by selection for early seed development and maturity during cultivar development, as early seed availability is desired by plant breeders for seed production. We performed crosses between late bolting accessions for enhanced bolting delay, as well as crosses of early and late bolting accessions to obtain mapping populations for QTL analysis of bolting behaviour. The large genetic variation within the species *Beta* creates an opportunity for the development of desired winter beets by crossing late bolting accessions among each other to accumulate late bolting alleles. However, creation of non bolting genotypes is only the first step towards a system of bolting control, as bolting is necessary for seed

production. Therefore, controlled bolting is needed which can only be achieved by genetic modification.

### A concept for bolting control of beets

Different concepts for flowering time and bolting control in crops have recently been published by JUNG and MÜLLER (2009). As an alternative to the above mentioned selection procedure genetic modification will be used. We will over-express floral repressor genes of *A. thaliana* and *B. vulgaris* in sugar beet. Furthermore, we will express a hairpin RNAi-mediating construct to silence a floral promoter gene of sugar beet. In order to control the expression of the floral repressor genes and the silencing construct, we will use the FLP-FRT recombinase system of *Saccharomyces cerevisiae* (KILBY et al. 1995). This system will allow regular bolting and flowering in both parental hybrid components for hybrid seed production. One hybrid component line will contain a transgene for constitutive expression of an FLP recombinase. In contrast, the second component will contain a transgene consisting of the selectable marker gene *nptII* under control of a strong promoter and the non active bolting repressor construct without promoter. The *nptII* gene is flanked by FLP recognition site repeats (FRT sites). After crossing, both transgenes will be combined. The FLP recombinase will recognize the FRT sites flanking *nptII* and eliminate the *nptII* gene by recombination, thereby putting the floral repressor construct under the control of the strong promoter that had controlled the *nptII* gene before recombination. Thus, the floral repressor construct will be activated only in plants grown from hybrid seeds produced for field cultivation. For transformation experiments a number of flowering time candidate genes have been isolated

(MÜLLER et al. 2007). Using genes from *A. thaliana* and *B. vulgaris*, vectors have already been constructed to begin sugar beet transformation.

## References

- FRESE L, 2000: The synthetic *Beta* core collection - state of the art. *J Sugar Beet Res* 37(3), 1-10.
- JAGGARD KW, WERKER AR, 1999: An evaluation of the potential benefits and costs of autumn-sown sugarbeet in NW Europe. *J Agric Sci* 132, 91-102.
- JUNG C, MÜLLER AE, 2009: Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends Plant Sci* 14, 563-573.
- KILBY NJ, DAVIES GJ, SNAITH MR, MURRAY JAH, 1995: *Flp* recombinase in transgenic plants - Constitutive activity in stably transformed tobacco and generation of marked cell clones in *Arabidopsis*. *Plant J* 8, 637-652.
- MÜLLER A, BÜTTNER B, HOHMANN U, JUNG C, 2007: Functional genomics of flowering transition in sugar beet. Bericht 57. Tagung 2006 der Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 41-42. BAL Gumpenstein, Irdning.

# Fusarium head blight in barley: identification of the causal *Fusarium* species in Europe and testing of resistance using artificial inoculation

Philipp Holzknacht<sup>1</sup>, Paul Bury<sup>2</sup>, Marc Lemmens<sup>1\*</sup> and Hermann Buerstmayr<sup>1</sup>

## Abstract

Fusarium head blight (FHB) in barley can be caused by different *Fusarium* species producing various mycotoxins. Breeding for resistance requires 1) resistance sources and 2) a reliable screening technique. We wanted to investigate FHB resistance of a barley nursery as a basis for future breeding programs. We also compared different inoculation methods and the resistance to DON (deoxynivalenol)/NIV (nivalenol) and T2/HT2-toxin producing *Fusarium* species. We started with the isolation, purification and identification of *Fusarium* isolates from infected barley kernels originating from France, Germany and the UK. In total 63 isolates were identified belonging to 8 different *Fusarium* species. Most frequently detected isolates in Germany was *F. poae*, in France *F. cerealis* and *F. graminearum* and in the UK *F. avenaceum*. FHB resistance was tested with spray inoculation and with the

kernel spawn method. Five different *Fusarium* species were used for inoculation. Scored was disease incidence and severity. ANOVA analyses showed highly significant differences between genotypes and treatments. Resistance data obtained with both inoculation techniques and with most *Fusarium* species were significantly related ( $r = 0.57-0.81$ ). Correlation coefficients between disease incidence and severity data were highly significant ( $r = 0.93-0.99$ ). We could not find any evidence for specific resistance against a particular type of toxin producer.

## Keywords

*Fusarium*, *Hordeum vulgare*, mycotoxin, resistance

## Acknowledgments

This work was funded by Syngenta Seeds Ltd., UK

<sup>1</sup> BOKU, University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Department IFA-Tulln, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

<sup>2</sup> Syngenta Seeds Ltd, Cambridge, UK

\* Ansprechpartner: Dr. Marc LEMMENS, marc.lemmens@boku.ac.at

# Longevity of seeds - intraspecific differences in the Gatersleben genebank collections

Manuela Nagel<sup>1\*</sup>, Mian Abdur Rehman Arif, Maria Rosenhauer and Andreas Börner

## Abstract

The federal *ex situ* genebank of Germany in Gatersleben is with some 150 000 accessions one of the largest of the world. About 130 000 accessions are kept as seeds. Information about optimum storage conditions, germinations and seed longevities are important for running processes. The current study is dedicated to the seed longevity of barley, wheat, rye, sorghum, flax and oilseed rape. Unfortunately, there is only a tendency for the long-life behaviour of a species. Seed longevity itself is strongly influenced by the genotype of species which can be depending on factors as plant height and husk.

## Keywords

Genebank, genetic diversity, intraspecific variability, seed storage

## Introduction

Nowadays the trait 'seed longevity' is a primary feature for a running genebank. Information about longevity of species is important for storage periods, reproduction cycles and germination test intervals. Nevertheless, the trait itself was not considered highly relevant until the beginning of the 20<sup>th</sup> century. At that time, the Russian botanist and ecologist Nicolai I. Vavilov recognized, as one of the first, that our plant genetic resources are in particular danger and need to be conserved for the future (MAXTED et al. 1997). These efforts were followed by the establishment of modern genebanks around the world (LININGTON and PRITCHARD 2001), which led to an increasing interest in the storage behaviour of seeds. HAFERKAMP et al. (1953), PRIESTLEY et al. (1985), STEINER and RUCKENBAUER (1995), WALTERS et al. (2005) and NAGEL and BÖRNER (2010) investigated seed longevities of crop plants under ambient, cold and ultra-dry storage conditions. Consistently they agree that the longevity of seed is different

between species and depends on the storage conditions. Depending on the conditions and the species the viability can last between months and decades. Moreover, different discoveries have demonstrated that under certain conditions seeds can survive for hundreds of years. The seeds of a date palm (*Phoenix dactylifera* L.) provide a famous example of extreme longevity. These seeds were discovered beneath a Heriodin fortress in Israel and germinated after 2000 years (SALLON et al. 2008). Furthermore, 200-year-old seeds could germinate in the Millennium Seed Bank at the Royal Botanic Gardens Kew. The material originated from a trip to the Cape of Good Hope in 1803. A Dutch merchant brought the seeds by ship to London where they were stored in the Tower of London and later on in the National Archives (KEW 2006). However, the longevity of seeds has always defined for the species.

The following study will show, differences not only exist between species, but also between the genotypes within a species. The material under study belonged to the *ex situ* genebank for agricultural and horticultural crop plants in Gatersleben, which houses some 150 000 accessions, covering over 3000 species within 890 genera. In general, orthodox seeds are conserved at -15°C, while vegetatively reproduced plant materials are maintained by *in vitro* culture and cryo-conservation. Seed storage accounts for about 90% of the stored material (BÖRNER 2006).

## Material and methods

For investigating the intraspecific variability of seed longevity, Gatersleben genebank accessions of barley (*Hordeum vulgare* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.), rye (*Secale cereale* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* L.), oilseed rape (*Brassica napus* L.) and flax (*Linum usitatissimum* L.) were used. The material was stored in glass jars topped with silica gel at 8±2% seed moisture content. Number of accessions, countries of origin, harvest year and storage temperature are given in Table 1.

Table 1: Species, number of accessions, countries of origin, harvest year and storage temperature of material used for germination test

Species	Accessions	Countries of origin	Harvest year	Storage temperature
Barley	50	14	1974	±0°C, since 2008: -15°C
Wheat	41	18	1974	±0°C, since 2008: -15°C
Rye	36	9	1982	±0°C; since 1998: -15°C
Sorghum	5	4	1978	±0°C, since 2006: -15°C
Oilseed rape	45	6	1983	-15°C
Flax	52	12	1978	-15°C

<sup>1</sup> Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstraße 3, D-06466 GATERSLEBEN

\* Ansprechpartner: Dr. Andreas BÖRNER, boerner@ipk-gatersleben.de

For investigating the intraspecific variability seeds were tested in three replications consisting of 50 seeds each. Each replication was germinated according to the ISTA (International Seed Testing Association) rules. The germination percentage was calculated from the proportion of normal appearing seedlings (ISTA 2008).

## Results and Discussion

Germination after 26 up to 33 years of storage was assessed among the different crop species (Figure 1A-F). Most crops showed high germination when germinated within 5 years post harvest, but germination of most accessions within species separated strongly after 20 years. In particular, wheat germination resulted between 0 and 87% after 34 years of storage (Figure 1B) and barley accessions germinated

between 43 and 95% after 35 years (Figure 1A). A paired t-test showed significant differences between genotypes of the species after the recent germination test.

In general, as has been documented by ROBERTS (1972), germination decreased over storage time in a sigmoid fashion, as visible in Figure 1E, whereby the parameters of these curves seemed to be species specific. Especially rye accessions (Figure 1C) had already reduced germinations (between 8 and 47%) after 27 years. Similarly, most oilseed rape accessions (Figure 1E) had germinations below 50%. Only few remained over 50%. Contrary to those species, different barley genotypes (Figure 1A) decreased slightly in their germination and remained predominantly over 50%. Therefore, a tendency for the long-life of a seed is given for the species but, as seen, the genotypes of a species differ within.

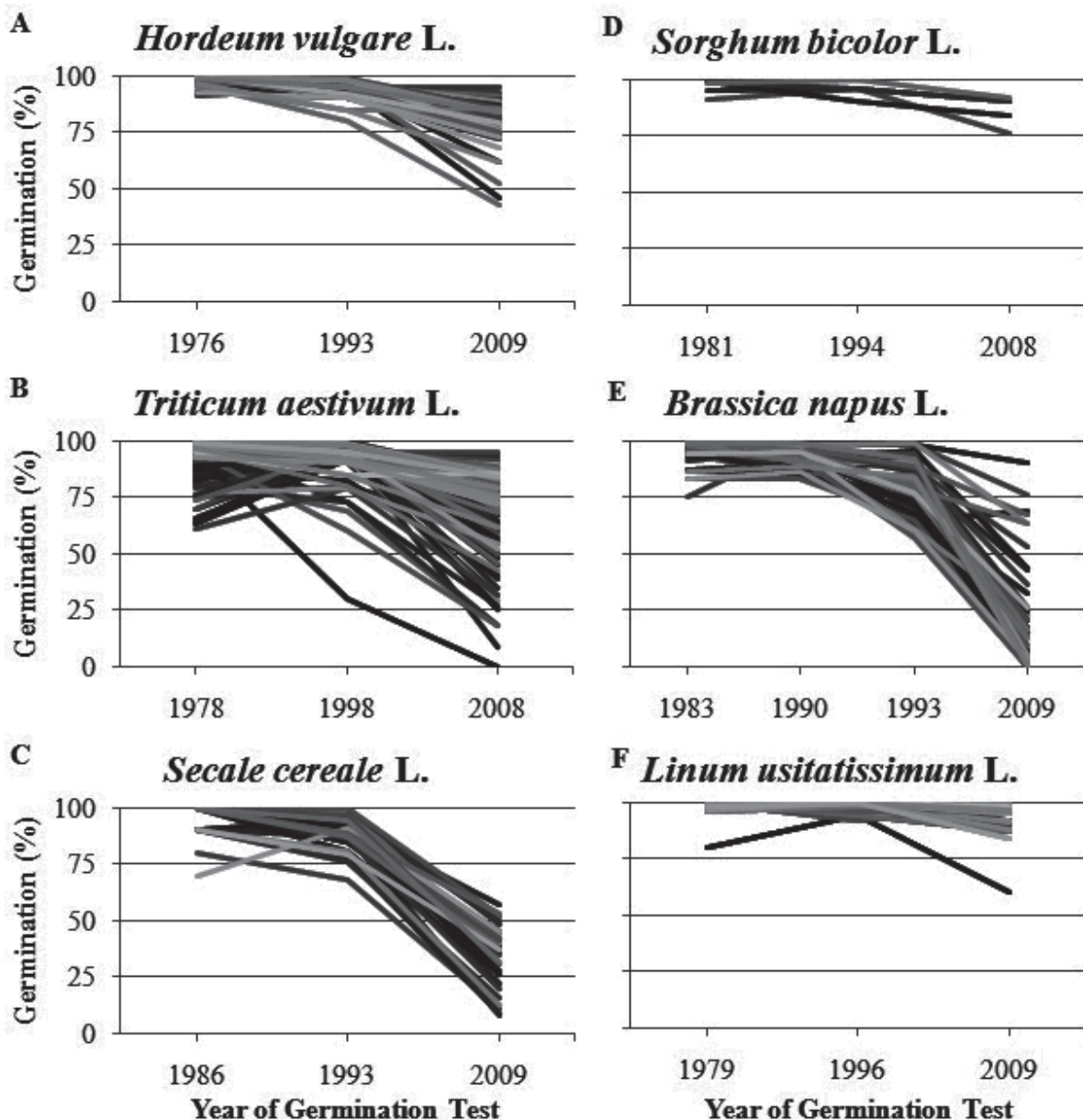


Figure 1: Mean germinations of barley (A), wheat (B), rye (C), sorghum (D), oilseed rape (E) and flax (F) accessions in different years of testing

Due to the same harvest year, the same cleaning methods and storage conditions of the genotypes of the species under investigation it can be assumed that differences in germination are genetically based. First aging and germination tests with barley mapping populations give a hint that traits like plant height, husks just as abiotic and biotic factors during the season can influence the seed longevity (NAGEL et al. 2009). Therefore, the viability equation as published by ELLIS and ROBERTS (1980) can forecast a longevity tendency but the behaviour of a specific genotype depends on more factors than moisture content, storage temperature and initial viability and is unpredictable at the moment.

## Conclusion

The investigations on genebank material showed that the seed longevity is not only different between species it also differs between genotypes of a species. Although barley and flax seeds show a long-living tendency and rye and oilseed rape a more short-living trend the genotypes vary in germinations. On basis of the identical harvest years and conditions as cleaning as storage conditions, genetic factors for seed longevity can be assumed.

## Acknowledgements

The authors wish to acknowledge past and current staff of the Gatersleben genebank. Special thanks are due to Sibylle Pistrick, Stephanie Thumm and Arne Brathuhn for providing great help and scientific data.

## References

BÖRNER A, 2006: Preservation of plant genetic resources in the biotechnology era. *Biotechnol J* 1, 1393-1404.

- ELLIS RH, ROBERTS EH, 1980: Improved equations for the prediction of seed longevity. *Ann Bot* 45, 13-30.
- HAFERKAMP ME, SMITH L, NILAN RA, 1953: Studies on aged seeds. I. Relation of age of seed to germination and longevity. *Agron J* 45, 434-437.
- ISTA, 2008: International rules for seed testing. International Seed Testing Association, Bassersdorf.
- KEW, 2006: Germinating history: 200 year old seeds spring to life. Press Release, Royal Botanic Gardens, Kew [Available online: [http://www.kew.org/press/archive\\_seeds.html](http://www.kew.org/press/archive_seeds.html); accessed 14 Jan 2010].
- LININGTON SH, PRITCHARD HW, 2001: Gene Banks. In: Levin SA (eds), *Encyclopaedia of biodiversity*, Vol. 3, 165-181. Academic Press, San Diego.
- NAGEL M, BÖRNER A, 2010: The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Sci Res*, in press. DOI:10.1017/S0960258509990213.
- NAGEL M, VOGEL H, LANDJEVA S, BUCK-SORLIN G, LOHWASER U, SCHOLZ U, BÖRNER A, 2009: Seed conservation in ex situ genebanks - genetic studies on longevity in barley. *Euphytica* 170, 5-14.
- MAXTED N, FORD-LLOYD VV, HAWKES JG, 1997: Plant genetic conservation. The in situ approach. Chapman & Hall, London.
- PRIESTLEY DA, CULLINAN VI, WOLFE J, 1985: Differences in seed longevity at the species level. *Plant Cell Env* 8, 557-562.
- ROBERTS EH, 1972: Viability of seeds. Chapman & Hall, London.
- SALLON S, SOLOWEY E, COHEN Y, KORCHINSKY R, EGLI M, WOODHATCH I, SOMCHONI O, KISLEV M, 2008: Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science* 320, 1464.
- STEINER AS, RUCKENBAUER P, 1995: Germination of 110-year-old cereal and weed seeds, the Vienna sample of 1877. Verification of effective ultra-dry storage at ambient temperature. *Seed Sci Res* 5, 195-199.
- WALTERS C, WHEELER LM, GROTENHUIS JM, 2005: Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Sci Res* 15, 1-20.



# Phänotypische Charakterisierung der Anfälligkeit von Weizensorten gegenüber Schwarzrost (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) in Österreich

## Phenotypic characterisation of susceptibility of wheat cultivars to wheat stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) in Austria

Michael Oberforster<sup>1\*</sup>, Martin Plank<sup>2</sup> und Gerhard Bedlan<sup>2</sup>

### Abstract

Due to the fact that stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) rarely appears in wheat trials, the cultivars are inoculated with a spore suspension of local races of stem rust. In each individual year the infestation correlated significantly ( $r=0.68^{**}$  to  $0.96^{**}$ ) with the adjusted mean values of the cultivars. The results of the trial in Grabenegg in 2004 verified the close relationship between the occurrence of symptoms (average symptoms in percentage and/or AUDPC) and relative loss of 1000 grain mass ( $r=0.95^{**}$ ). The disease-loss-relationship is curvilinear. Concerning stem rust, the registered winter wheat cultivars in Austria range from resistant to highly susceptible. Cultivars like Arktis, Arnold, Balaton, Fulvio, Impulsiv, Jenga, Josef, Lukullus, Midas, Pedro, Renan, Stefanus, Vulcanus and Winnetou are highly resistant. Among cultivars such as Augustus, Belmondo, Complet, Energo, Eriwan, Grandios, Henrik, Kerubino, Megas, Papageno, Pegassos, Profit and Xenos, stem rust usually spreads rapidly after inoculation. The evaluation of results from 1960 to 2009 on winter wheat and spring wheat shows no substantial progress in breeding (in the form of a trend) concerning this disease.

### Keywords

Adult plant resistance, artificial inoculation, *Triticum aestivum*

### Einleitung

Der Schwarzrost ist eine auf allen Kontinenten verbreitete Krankheit bei Getreidearten und zahlreichen Gräsern. Schwarzrost des Weizens (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erikss. et Henn.) kann Weich- (*Triticum aestivum*) und Durumweizen (*T. durum*) sowie Dinkel (*T. spelta*) und andere *Triticum* Arten infizieren. Am häufigsten erscheinen die Symptome an den Halmen und Blattscheiden, jedoch können auch Blattspreiten, Spelzen und Grannen betroffen sein. Da die Krankheit verhältnismäßig spät auftritt, leidet vor allem die Kornausbildung. Als Zwischenwirte für die geschlechtliche Phase fungieren die Pflanzengattungen *Berberis* und *Mahonia*. In unseren Breiten handelt es sich zumeist um die zerstreut bis häufig vorkommende Ge-

wöhnliche Berberitze (*Berberis vulgaris* L.). Weiters ist im Frühjahr ein Einwehen von Uredosporen aus südlichen Ländern möglich. In Europa verlor der Weizenschwarzrost an Bedeutung. In Österreich gab es letztmalig 1972 und 1977 stärkere Ertragsschäden (ZWATZ 1982).

### Material und Methoden

Der natürliche Befall in offiziellen Weizenprüfungen zwischen 1960 und 2005 bildet die Datenbasis. Die Symptome wurden nach dem Schema von 1 bis 9 (1 = Befall, 5 = mittlerer Befall, 9 = sehr starker Befall) erfasst. In Prüfungen mit künstlicher Infektion (1990 bis 2009) wurde die prozentuell befallene Halmfläche erhoben. In Grabenegg bei Wieselburg wurden bei Winterweizen im Jahr 2004 die Tausendkorngewichte der unbehandelten Kontrolle mit der inokulierten Variante verglichen (OBERFORSTER et al. 2006).

### Versuchsaufbau:

Blockanlage (Versuch 1 und 2), jeweils zweifach wiederholt, 58 Sorten und Zuchtlinien, Parzellenfläche 1,0 m<sup>2</sup>, Aussaat am 15. Oktober 2003, Ernte am 11. August 2004.

### Inokulation:

Durchführung am 17. Mai 2004 (BBCH 33), Gemisch diverser Schwarzroststrassen, 0,5 ml Suspension (1 mg Uredosporen) wurden in die oberste Blattscheide injiziert, 5 Applikationen je Parzelle.

### Befallserhebung:

Viermalige Bonitur (von 15. Juni (BBCH 65) bis 27. Juli (BBCH 83)) der prozentuell befallenen Halmfläche der Parzelle, die Kontrollvariante zeigte keine Symptome von Schwarzrost. Beschreibung der Epidemie mittels AUDPC (area under the disease progress curve), zur Darstellung wurden die Daten relativiert (Wert 7100=100%). Parzellenspezifische Erhebung des Tausendkorngewichtes (TKG); Probenumfang jeweils 20 g.

### Ergebnisse und Diskussion

Als Gründe für das Ausbleiben von Epidemien werden klimatische Änderungen, der Anbau frühreifer Sorten sowie die Resistenzzüchtung in Ost- und Südosteuropa

<sup>1</sup> Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Sortenwesen, Spargelfeldstraße 191, 1220 WIEN

<sup>2</sup> Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Pflanzengesundheit, Spargelfeldstraße 191, 1220 WIEN

\* Ansprechpartner: Dipl.-Ing. Michael OBERFORSTER, michael.oberforster@ages.at

**Tabelle 1: Mittlerer Schwarzrostbefall, Variabilität des Befalls und Korrelation zu langjährigen Sortenmittelwerten bei Winterweizen nach Inokulation von 1999 bis 2009****Table 1: Mean stem rust infection, variability of infection and correlation to the longterm average of winter wheat cultivars after artificial inoculation from 1999 to 2009**

Jahr	Anzahl der			Mittlerer jährl. Befall (%)	Spannweite Sorten (%)	Korrelation zu langjähr. Mittel (r)
	Versuche	Bonituren	Sorten			
1999	2	4	52	16	0 - 50	0,68**
2001	3	3	46	33	0 - 80	0,86**
2002	1	1	40	59	0 - 100	0,91**
2003	2	2	47	56	0 - 90	0,84**
2004	2	6	51	30	0 - 58	0,96**
2005	2	8	40	5	0 - 25	0,78**
2006	2	3	46	11	0 - 77	0,81**
2007	2	7	44	20	1 - 51	0,96**
2008	1	4	46	13	0 - 62	0,90**
2009	1	4	48	19	0 - 70	0,96**

**Tabelle 2: Schwarzrostbefall bei ausgewählten Winterweizensorten nach Inokulation in Grabenegg 2004 (Mittlere Befallsstärke, AUDPC-Wert) und relative Minderung des Tausendkorngewichts****Table 2: Stem rust infection of selected winter wheat cultivars after artificial inoculation in Grabenegg 2004 (average infection, absolute and relative AUDPC) and decrease of 1000 grain mass (TKG)**

Sorte	Herkunftsland	Zulassungsjahr	Befall	AUDPC		TKG	APS <sup>1</sup> in
			Mittelwert (%)	absolut	relativ	Minderung (%)	BSL 2010
Xenos	DE	1998	76	3756	53	46	6
Complet	DE	1996	74	3631	51	56	6
Augustus	AT	2002	73	3543	50	51	6
Fridolin	AT	2003	73	3519	50	35	5
Pegassos	DE	1996	71	3454	49	45	6
Belmondo	DE	1997	69	3396	48	48	6
Achat	AT	1997	71	3350	47	41	5
Brutus	AT	1993	68	3253	46	38	5
Exquisit	AT	1995	67	3248	46	52	5
Romanus	NL	2000	69	3239	46	39	5
Kerubino	DE	2004	65	3050	43	34	6
Ludwig	AT	1997	63	2941	41	31	5
Levendis	DE	2002	61	2888	41	22	5
Ilias	NL	2002	62	2819	40	51	5
Granat	AT	2000	61	2794	39	51	5
Grandios	DE	1999	60	2745	39	18	6
Bonitus	AT	2000	58	2671	38	39	5
SW Maxi	DE	2003	55	2589	36	27	5
Dekan	DE	1999	55	2418	34	31	5
Manhattan	DE	2002	44	1910	27	33	4
Capo	AT	1989	38	1764	25	6	4
Lukas	AT	2004	33	1596	22	10	4
Eurofit	AT	2004	30	1246	18	11	4
Astardo	AT	2003	17	632	9	0	3
Pireneo	AT	2004	15	497	7	3	3
Antonius	AT	2003	10	391	6	6	3
Saturnus	AT	2000	8	228	3	4	3
Edison	AT	2001	5	141	2	0	2
Komfort	UK	2000	3	81	1	2	2
Furore	AT	1998	2	78	1	4	3
Renan	FR	1993	1	44	1	3	2
Donnato	AT	2008	1	40	1	0	2
Erla Kolben	AT	1961	1	33	0	7	3
Atrium	AT	2001	1	33	0	-1	2
Josef	AT	1993	1	16	0	3	2
Winnetou	DE	2004	0	0	0	2	2
Exklusiv	AT	1999	0	0	0	2	2

<sup>1</sup> Ausprägungsstufe Beschreibende Sortenliste 2010: 1 = sehr geringe Anfälligkeit, 9 = sehr starke Anfälligkeit

genannt (CSÓSZ et al. 1995, BARTOŠ et al. 2002). Eine eingehende Erforschung der Ursachen wäre sinnvoll. Denn tendenziell höhere Temperaturen im Frühjahr und Sommer kommen den Ansprüchen des thermophilen Pilzes entgegen. Ein züchterischer Trend zu zeitiger Reife der Winter- und Sommerweizen ist im österreichischen Sortiment nicht nachweisbar. Auch die allgemeine phänologische Verfrühung bietet angesichts der jährlich variablen Witterung sowie dem Anbau anfälliger Sommerweizensorten keine schlüssige Erklärung. In Österreich sind auch keine Aktionen zur Vernichtung der Berberitze wie in anderen Ländern bekannt, das Verbreitungsareal blieb in den vergangenen Jahrzehnten weitgehend unverändert. Überdies trägt der Zwischenwirt wenig zum Entstehen von Epidemien bei (ZWATZ 1982). Obwohl der Weizenschwarzrost aktuell wenig bedeutsam ist, sind künftige Schäden nicht auszuschließen.

Sowohl natürliche als auch künstliche Infektionen ermöglichen eine ausreichende Differenzierung der Genotypen. Eine gute Widerstandskraft gegen Schwarzrost bedeutet einen späteren Beginn oder einen verlangsamten Anstieg des Befalls. Aufgrund des fehlenden natürlichen Krankheitsdrucks selektieren die österreichischen Weizenzüchter seit etwa 15 Jahren nicht mehr systematisch gegen Schwarzrost. Dennoch weisen auch neuere Sorten teilweise ein hohes Resistenzniveau auf. Im Rahmen der Wertprüfung wird seit 1990 an ein bis drei Standorten mit Schwarzrost inokuliert. Ein Gemisch einheimischer, allerdings nicht exakt definierter Rassen wird in Mikroparzellen eingebracht. Diese Tests liefern zumeist aussagekräftige Daten. Der Befall in einzelnen Jahren (1999 bis 2009) korreliert mit  $r=0,68^{**}$  bis  $0,96^{**}$  zu langjährigen (1990 bis 2009) adjustierten Sortenmittelwerten (Tabelle 1).

Über den genetischen Hintergrund der Schwarzrostresistenz von in Österreich angebauten Sorten ist wenig bekannt. Der 1961 registrierte Winterweizen Erla Kolben enthält das Resistenzgen *Sr5* (ZWATZ 1982). Für Achat werden *Sr7b* und für Capo *Sr17* angeführt (PATHAN et al. 2007). Die in Frankreich gezüchtete Sorte Renan ist Träger von *Sr38* (HANZALOVÁ et al. 2007). *Sr31* (von Roggen) und *Sr36* (von *T. timopheevi*), welche im ungarischen Sortiment bedeutsam sind (PURNHAUSER et al. 2009), dürften bei uns nicht bzw. wenig vorkommen. Insgesamt sind gegen Schwarzrost 46 Resistenzfaktoren katalogisiert (SINGH et al. 2008), mit Ausnahme von *Sr2* verhalten sie sich rassenspezifisch. Im Jahr 1999 trat in Uganda eine neue Schwarzroststrasse (Ug99, auch als TTKS bekannt) auf, welche für *Sr31* und weitere Faktoren virulent ist (PRETORIUS et al. 2000). Der Pathotyp breitete sich in einige Länder Afrikas und des mittleren Ostens aus. Befürchtungen, wonach Ug99 den Weizenanbau in Europa beeinträchtigen könnte, sind eher hypothetisch (FOSSATI, pers. Mitt.).

#### Winterweizen Grabenegg 2004:

Am 15. Juni (BBCH 65), 29 Tage nach erfolgter Inokulation mit Schwarzrost, waren lediglich 11 von 58 Weizensorten noch ohne Symptome. Am 27. Juli wiesen 54 Genotypen einen geringfügigen bis totalen Befall auf. Das Mittel von vier Boniturterminen zeigt mit einer befallenen Halmfläche von 0 bis 82% bzw. relativen AUDPC-Werten von 0 bis 59% eine beachtliche Spannweite. Eine Minderung des Tausendkorngewichts, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, von 0 (-1) bis 65% ging damit einher. Anders als bei ZWATZ (1982) nimmt die Befalls-Verlust-Relation einen kurvenförmigen Verlauf. Eine Befallstärke von 20% Schwarzrost reduzierte

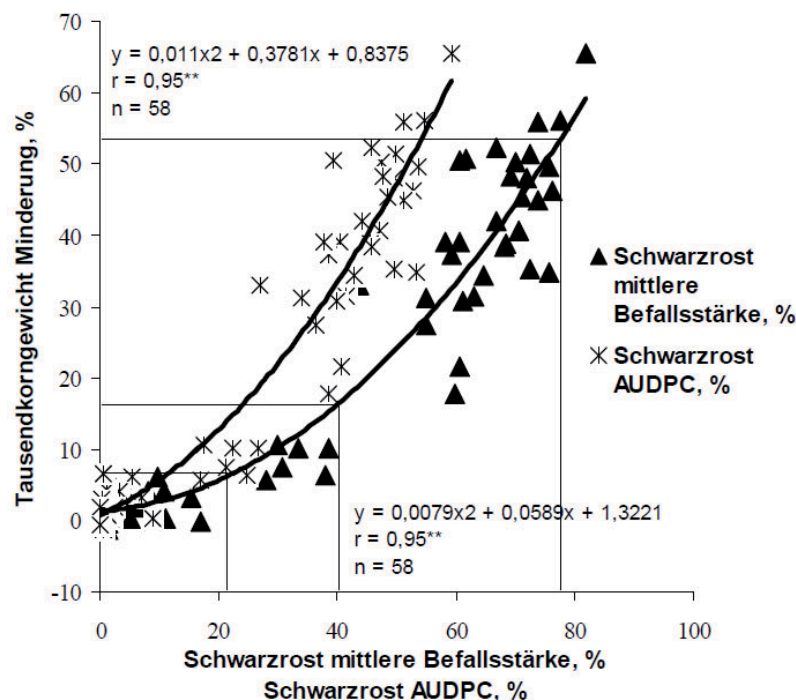


Abbildung 1: Einfluss des Schwarzrostbefalls bei Winterweizensorten nach Inokulation in Grabenegg 2004 (Mittlere Befallsstärke, relativer AUDPC-Wert) auf die relative Minderung des Tausendkorngewichts

Figure 1: Relationship between stem rust infestation after artificial inoculation of winter wheat cultivars in Grabenegg 2004 (mean infestation=curve with star symbols, relative AUDPC=curve with triangle symbols) and relative decrease in 1000 grain mass

das Tausendkorngewicht um etwa 7%, bei 40% Schwarzrost waren es durchschnittlich 17%. Ein Befall von 80% bedeutete Einbußen beim Tausendkorngewicht bzw. Ertrag von 50 bis 60% (Tabelle 2, Abbildung 1). Die Fläche unter der Krankheitskurve (AUDPC) und die mittlere Befallsstärke (in %) korrelierten mit  $r=0,95^{**}$  zur relativen Minderung des Tausendkorngewichts. Beide Parameter waren für die Evaluierung der Sortenresistenz weitgehend gleichwertig. Auch die Beurteilung nach dem Schema von 1 bis 9 fiel in der Präzision nur geringfügig ab. Auf die Anlage von zwei Versuchen je Standort und eine aufwändige Ermittlung von Korngröße und Ertrag ist verzichtbar.

Die höchste Feldresistenz gegenüber Schwarzrost, d.h. eine Ausprägungsstufe (APS) 2 in der Beschreibenden Sortenliste (AGES 2010) zeigen die Winterweizen Arktis, Arnold, Atrium, Balaton, Bitop, Donato, Edison, Exklusiv, Fidelius, Fulvio, Impulsiv, Jenga, Josef, Komfort, Lukullus, Midas, Pedro, Peppino, Renan, Stefanus, Vulcanus und Winnetou. Am anfälligsten sind Augustus, Belmondo, Complet, Energo, Eriwan, Grandios, Henrik, Kerubino, Megas, Papageno, Pegassos, Profit und Xenos (APS 6 bis 8). Die Sommerweizen differenzieren im Merkmal Schwarzrost von gut widerstandsfähig (Sparrow) bis stärker anfällig (Alora, Michael, Monsun, Sensas, SW Kadrlj). Bei Winter- und Sommerdurum sind resistente bis mittelgut widerstandsfähige Sorten vorhanden.

## Zusammenfassung

Da in den Weizenversuchen Schwarzrost aus natürlicher Infektion kaum mehr auftritt, werden die Sorten mit einer Sporensuspension einheimischer Schwarzroststrassen inokuliert. In den einzelnen Jahren korrelierte der Befall signifikant ( $r=0,68^{**}$  bis  $0,96^{**}$ ) mit adjustierten Sortenmittelwerten. Die Resultate des Versuches in Grabenegg 2004 bestätigen den engen Zusammenhang zwischen Symptombonitur (mittlerer Befall in Prozent bzw. AUDPC) und relativer Minderung des Tausendkorngewichts ( $r=0,95^{**}$ ). Die Befalls-Verlust-Beziehung verläuft kurvenförmig. In Österreich registrierte Winterweizen sind hinsichtlich Schwarzrost resistent bis stark anfällig. Als hoch widerstandsfähig gelten beispielsweise Arktis, Arnold, Balaton, Fulvio, Impulsiv, Jenga, Josef, Lukullus, Midas, Pedro, Renan, Stefanus, Vulcanus und Winnetou. In Beständen von Augustus, Belmondo, Complet, Energo, Eriwan, Grandios,

Henrik, Kerubino, Megas, Papageno, Pegassos, Profit und Xenos breitet sich Schwarzrost nach Inokulation meist rasch aus. Die Auswertung der Ergebnisse für Winter- und Sommerweizen von 1960 bis 2009 lässt bei dieser Krankheit keinen relevanten züchterischen Fortschritt (im Sinne eines Trends) erkennen.

## Literatur

- AGES, 2010: Österreichische Beschreibende Sortenliste 2010 - Landwirtschaftliche Pflanzenarten. Schriftenreihe 21/2010.
- BARTOŠ P, HANZALOVÁ A, DUMALOSOVÁ V, 2002: Rost auf Weizen in der Tschechischen Republik - historisch und aktuell. In: Bericht über die 52. Tagung 2001 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 20.-22. Nov., BAL Gumpenstein, Irdning, 17-20.
- CSÓSZ M, MATUZ J, MESTERHÁZY Á, 1995: Epidemiologisches Verhalten des Weizen-Schwarzrostes. Beobachtungen auf der Basis der Center-Pivot-Methode. In: Bericht über die 46. Arbeitstagung der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter, 21.-23. Nov., BAL Gumpenstein, Irdning, 101-109.
- HANZALOVÁ A, DUMALASOVÁ V, SUMÍKOVÁ T, BARTOŠ P, 2007: Rust resistance of the French wheat cultivar Renan. Czech J Genet Plant Breed 43, 53-60.
- OBERFORSTER M, PLANK M, BEDLAN G, 2006: Auftreten von Schwarzrost des Weizens (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) in Österreich und Befalls-Verlust-Relationen. In: Bericht ALVA-Jahrestagung 2006, 22.-23. Mai, St. Pölten, Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen, Wien, 207-210.
- PATHAN AK, PARK RF, 2007: Evaluation of seedling and adult plant resistance to stem rust in European wheat cultivars. Euphytica 155, 87-105.
- PRETORIUS ZA, SINGH RP, WAGOIRE WW, PAYNE TS, 2000: Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. Plant Dis 84, 203.
- PURNHAUSER L, BÓNAL, 2009: Detection of *Sr31* and *Sr36* stem rust resistance genes by molecular markers in wheat cultivars registered in Hungary. Res J Agric Sci 41, 319-322.
- SINGH RP, HODSON DP, HUERTA-ESPINO J, JIN Y, NJAU P, WANYERA R, HERRERA-FOESSEL SA, WARD RW, 2008: Will stem rust destroy the world's wheat crop? Adv Agron 98, 271-309.
- ZWATZ B, 1982: Studie über den Schwarzrost des Weizens (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erikss. et Henn.) in Österreich mit besonderer Untersuchung der Slow-rusting-Resistenz von Winterweizensorten. Bodenkultur 33, 246-274.

# Evaluierung frei abblühender Karottensorten unter biologischen Anbaubedingungen

## Evaluation of open pollinated carrot varieties under organic farming

Jürgen Renner<sup>1</sup>, Klaus Dürrschmid<sup>2</sup> und Heinrich Grausgruber<sup>1\*</sup>

### Abstract

About 70% of the registered carrot varieties in the European Union arise from hybrid breeding. In organic farming the use of hybrid varieties is discussed controversially. Due to the recent discussions on hybrid varieties an organic farm producing and marketing organic vegetables was looking forward to find an open pollinated carrot variety which is well adapted to the site of production and is consistent with the requirements of the farm. Therefore, a field experiment with 17 non-hybrid and one check hybrid variety was carried out. Besides agronomic traits several quality aspects were investigated by lab analyses and a hedonistic sensory test. The hybrid variety Maestro F1 showed the best performance in regard to economic traits but revealed deficits in nitrate level and the sensory test after four month storage. Three open pollinated varieties, i.e. N2 Milan, N2 Fynn and N2 Beate, revealed acceptable performance concerning economically important traits, e.g. marketable yield, homogeneity etc., and excellent inner quality, e.g. low nitrate concentration, high popularity in sensory tests in regard to taste and flavour. It is concluded that there exists enough variability in the currently available open pollinated varieties for the economic production of organic carrots. Furthermore, the positively selected non-hybrid varieties can form the basis for an open pollinated, farm and site specific selection programme.

### Keywords

*Daucus carota*, hybrid breeding, open pollinated varieties, organic farming, sensory test

### Einleitung

Die Karotte (*Daucus carota* L.) ist in Österreich mengenmäßig die dritt wichtigste Gemüseart. Die Produktion stellt für Bio-Landwirte einen bedeutenden Betriebszweig dar. Der Biohof Adamah (Glinzendorf, Marchfeld) ist auf die biologische Produktion von Wurzelgemüse spezialisiert. Der Betrieb ist auf hohe und sichere Erträge angewiesen, deswegen werden viele Hybridsorten angebaut. Innerhalb der biologischen Landwirtschaft ist der Einsatz von Hybridsorten jedoch in Diskussion gekommen (HAGEL 2001, ARNCKEN und DIERAUER 2005). Europaweit lag der Anteil an Hybridsorten an den in der EU registrierten Karottensorten bereits über 80%. Durch die Osterweiterung

hat sich die relative Anzahl an samenfesten Sorten wieder erhöht. Dennoch liegt der Anteil an Hybridsorten in der Europäischen Sortenliste über 70% (STADTLANDER 2005). Von Seiten des Produzenten kristallisierte sich der Wunsch nach einer frei abblühenden (OP) Speisekarotten-Hofsorte als anzustrebende Alternative heraus. Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden ob eine samenfeste Sorte den Anforderungen des Betriebes und der Konsumenten entsprechen kann. Am Ende der mehrjährig angelegten Versuche und den damit verbundenen Selektionen soll eine an den Produktionsstandort bestens angepasste Populationsorte stehen.

### Material und Methoden

Ende Mai 2008 wurden 17 frei abblühende Karottensorten unter betriebsüblicher biologischer Kulturführung am Biohof Adamah, Glinzendorf, angebaut und in Vergleich mit der Hybridsorte Maestro F1 gestellt. Das Versuchsdesign entsprach einer Blockanlage mit 4 Wiederholungen. Erhoben wurden agronomische Merkmale wie Ertrag und marktfähige Ware, sowie innere und äußere Qualitätsparameter. Die innere Qualität wurde an Hand von Nitratgehalt, Brix, Ascorbinsäuregehalt und P-Wert beurteilt. Für die Beschreibung der äußeren Qualität wurden Grünköpfigkeit, Deformiertheit, Platzfestigkeit, sortenuntypische Ausfärbungen und Glattschaligkeit herangezogen. Für den Ausgleich der am Feld aufgetretenen Bodentrends wurde die Software ASREML (A. Gilmour, NSW Agriculture, Wagga Wagga) herangezogen. Die adjustierten Werte wurden in der Folge einer Varianzanalyse und einem LSD Mittelwertvergleich mittels der Software SAS Vers. 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC) unterworfen. Der Test auf allgemeine Beliebtheit wurde über Statgraphics (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA) ausgewertet.

### Ergebnisse

Die Hybridsorte Maestro F1 war in den agronomischen Merkmalen Ertrag und marktfähige Ware unerreicht (*Abbildung 1*), hatte aber deutliche Defizite in Geschmack nach 4 Monate Einlagerung und Nitratgehalt (*Abbildung 2*). Die Erhebung der durch Mausverbiss geschädigten Rüben, in Relation zum Rübengesamtertrag, ergab, dass bei den Sorten N2 Milan, N2 Fynn, N2 Beate und N2 Narome die Schädigung bei bis zu 40% lag. Sie zeigten somit ein an und für sich akzeptabel hohes Leistungspotential. Die Hybridsorte war

<sup>1</sup> Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Universität für Bodenkultur, Gregor-Mendel-Straße 33, A-1180 WIEN

<sup>2</sup> Abteilung für Lebensmittelqualitätssicherung, Universität für Bodenkultur, Muthgasse 18, A-1190 WIEN

\* Ansprechpartner: Univ.Prof. Dr. Heinrich GRAUSGRUBER, heinrich.grausgruber@boku.ac.at

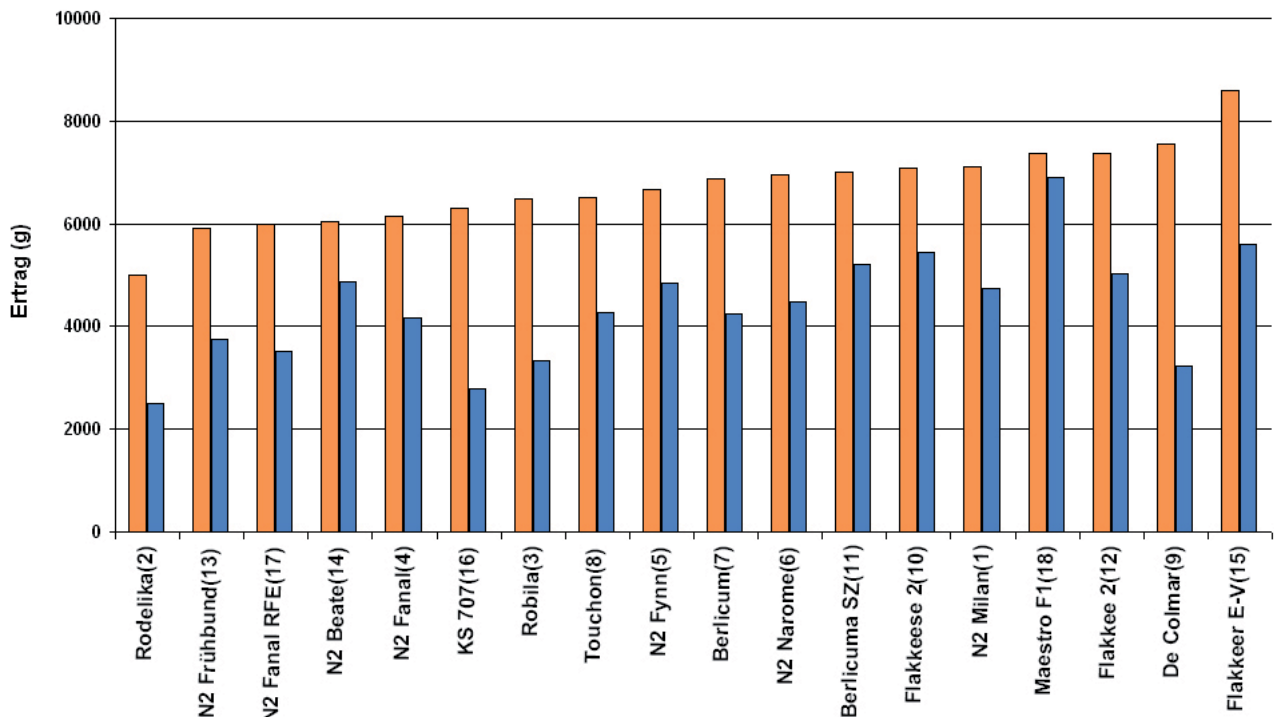


Abbildung 1: Rübengesamtertrag pro Dammmeter à 2 Reihen (orange Balken) und realisierte marktfähige Ware (blaue Balken) der getesteten Sorten (Vergleichshybridsorte = Maestro F1)

Figure 1: Yield per meter of raised bed with two rows (orange bars) and realised marketable yield (blue bars) of the tested varieties (hybrid variety = Maestro F1)

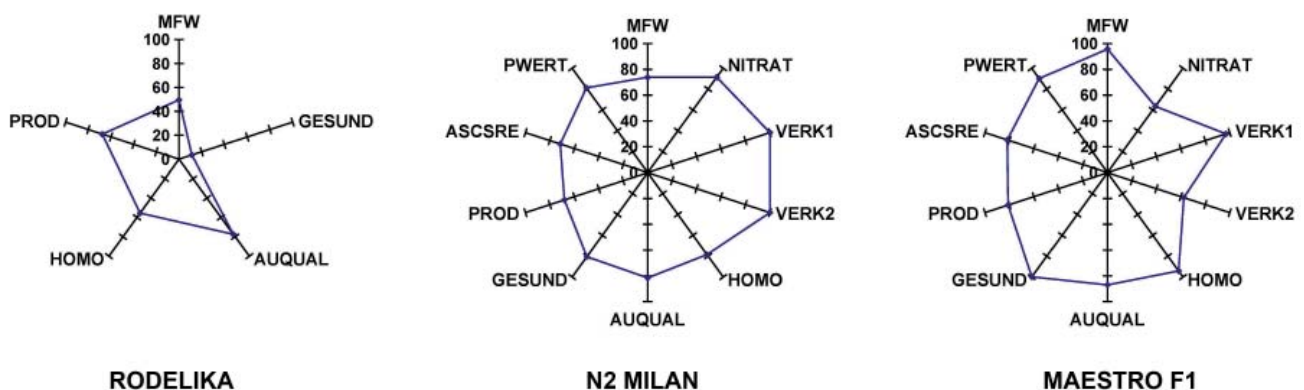


Abbildung 2: Beispiel für nicht geeignete (links) und geeignete OP-Sorten (Mitte), sowie die Vergleichshybridsorte (rechts). Relative Ausprägung der Merkmale marktfähige Ware (MFW), Nitratgehalt (NITRAT), Beliebtheitstest vor und nach Einlagerung (VERK1, VERK2), Homogenität (HOMO), äussere Qualität (AUQUAL), Blatt- und Wurzelgesundheit (GESUND), Eignung für die maschinelle Produktion (PROD), Ascorbinsäuregehalt (ASCRES), P-Wert (PWERT)

Figure 2: Selected examples for the classes unsuitable (left) and suitable (centre) open pollinated variety, and the check hybrid variety (right). Relative values of marketable yield (MFW), nitrate content (NITRAT), sensoric popularity before and after storage (VERK1, VERK2), uniformity (HOMO), extrinsic quality (AUQUAL), leaf and root health (GESUND), suitability for mechanical production (PROD), ascorbic acid content (ASCRES) and P value (PWERT)

anscheinend unter den Mäusen weniger beliebt - der Verbiss lag bei nur durchschnittlich 7% des Rübengesamtertrages. Der potentielle Anteil an marktfähiger Ware ist somit bei den von den Mäusen bevorzugten OP-Sorten höher als in *Abbildung 1* dargestellt. Die Mehrheit der OP-Sorten zeigte, die vom Markt geforderte, ausreichende Homogenität (Uniformität). Die aus der Literatur bekannten Sortenemp-

fehlungen für Rodelika, Robjila und KS 707 (FLECK et al. 2001, 2002) konnten nicht bestätigt werden. Die genannten Sorten zeigten agronomisch enorme Defizite (*Abbildung 1*). Besonders gravierend war unter den vorherrschenden Bedingungen auch die Anfälligkeit gegenüber Blatt- und Wurzelkrankheiten (*Abbildung 3*).

## Schlussfolgerungen

Die Hybridsorte Maestro F1 war in den agronomischen Merkmalen unerreicht, zeigte jedoch erhöhten Nitratgehalt und Mängel in der Beliebtheit (Verkostung) nach 4-monatiger Einlagerung. Einige OP-Sorten, wie N2 Milan, N2 Fynn, N2 Beate, zeigten akzeptables Leistungspotential bei ausreichender Homogenität und hervorragender Qualität (niedriger Nitratgehalt, guter Geschmack). Es besteht somit Hoffnung, dass es möglich sein sollte durch gezielte Selektion eine für den Biolandbau, unter den Produktionsbedingungen des Förderbetriebes, akzeptable samenfeste Karottensorten zu entwickeln. In Folgeversuchen soll nun die Eignung der besten OP-Sorten unter Trockenstress bzw. verschiedenen Bewässerungsregimen untersucht werden.

## Danksagung

Gerhard Zoubek gebührt für die Bereitstellung der Ressourcen vom Feld bis zum Lager ein herzlicher Dank. Weiters bedanken wir uns bei Dr. Karoline Jezik und Lukas Garch für die Unterstützung bei den Laboranalysen.

## Literatur

- ARNCKEN C, DIERAUER H, 2005: Hybridsorten im Bio-Getreide? Perspektiven und Akzeptanz der Hybridzüchtung für den Bio-Anbau. Coop Naturaplan-Fonds Biosaatgutprojekt Modul 1.4, FiBL, Frick.
- FLECK M, SIKORA F, GRÄNZDÖRFFER M, ROHMUND C, KÖLSCH E, VON FRAGSTEIN P, HESS J, 2001: Samenfeste Sorten oder Hybriden - Anbauvergleich von Möhren unter den Verhältnissen des Ökologischen Landbaus. In: Reents HJ (Hrsg.), Beiträge zur 6. Wissenschaftstagung zum Ökologischen Landbau, 6.-8. März, Weihenstephan, pp 253-256. Dr. Köster Verlag, Berlin.

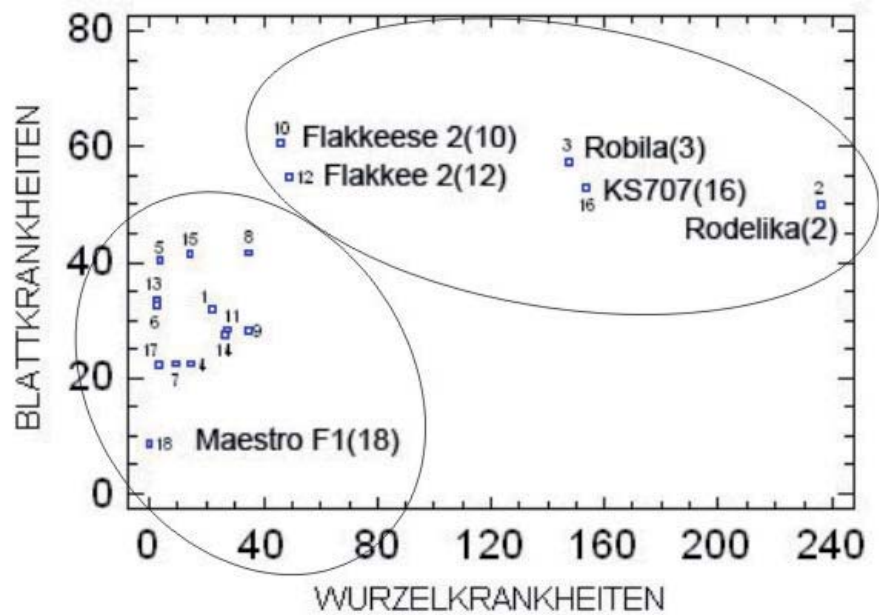


Abbildung 3: Boniturergebnisse der Blattkrankheiten (*Erysiphe heraclei*, *Alternaria dauci*) versus Wurzelkrankheiten (unspezifisch) (Höhere Werte kennzeichnen erhöhte Anfälligkeit)

Figure 3: Indices for leaf (*Erysiphe heraclei*, *Alternaria dauci*) and unspecific root diseases (the higher the index the more susceptible the variety)

- FLECK M, SIKORA F, ROHMUND C, GRÄNZDÖRFFER M, VON FRAGSTEIN P, HESS J, 2002: Samenfeste Sorten oder Hybriden - Untersuchungen an Speisemöhren aus einem Anbauvergleich an zwei Standorten des Ökologischen Landbaus. In: 37. DGQ Vortragstagung Qualität und Pflanzenzüchtung, 4.-5. März, Hannover, 167-172. Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V., Freising-Weihenstephan.
- HAGEL I, 2001: Zur Anbauwürdigkeit von Hybriden im biologisch-dynamischen Landbau. *Lebendige Erde* 6/2001, 36-39.
- STADTLANDER C, 2005: Studie zur Sortenvielfalt im Gemüsebau. Untersuchung zur Agrobiodiversität auf der Ebene der Gemüsesorten der EU unter besonderer Berücksichtigung der Züchtungsmethoden sowie Auswirkungen auf die Verfügbarkeit von Gemüsesorten für den biologischen Anbau [Available online: [http://orgprints.org/13263/1/stadlander\\_2005.pdf](http://orgprints.org/13263/1/stadlander_2005.pdf); accessed 8 Jan 2010].

# Development and evaluation of winter wheat breeding lines carrying Fusarium head blight QTLs from spring wheat

Aziz Salameh<sup>1,2</sup>, Bachar Almaghrabi<sup>1,3</sup> and Hermann Buerstmayr<sup>1\*</sup>

## Abstract

A series of BC<sub>2</sub> derived lines were developed from crosses of CM-82036 (Fusarium head blight (FHB) resistant spring wheat) with 11 winter wheat lines or cultivars as recurrent parents. BC<sub>2</sub> derived lines were chosen with either two QTL (*Fhb1*-3BS, *Qfhs.ifa-5A*), one of these or no QTL by use of linked SSR markers and evaluated for FHB severity in replicated field trails. Lines based on moderately resistant recurrent parents showed lower average FHB severity compared to lines based on susceptible recurrent parents. When comparing the FHB severity of related lines descending from the same recurrent parent but carrying different combinations of the two QTL, the general trend was that FHB severity decreased most when both spring wheat derived QTL (*Fhb1* and *Qfhs.ifa-5A*) were present and less when only one QTL was present. BC<sub>2</sub> derived lines with the winter

wheat alleles at both QTL regions showed generally more disease severity than lines with one or both QTL from spring wheat. Presence of *Qfhs.ifa-5A* increased plant height by 5-15 cm. All in all, introduction of two large effect QTL from spring wheat had a significant effect in reducing FHB susceptibility of winter wheat breeding lines.

## Keywords

Marker assisted selection, QTL, *Triticum aestivum*, validation

## Acknowledgments

Dr. A. SALAMEH 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).

<sup>1</sup> BOKU, University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Department IFA-Tulln, Institute for Biotechnology in Plant Production, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

<sup>2</sup> Hebron University, Hebron, Palestine

<sup>3</sup> BOKU-University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Department for Applied Plant Sciences and Plant Biotechnology, Institute for Plant Protection, Peter-Jordan-Str. 82, A-1190 VIENNA

\* Ansprechpartner: Dr. Hermann BUERSTMAYR, hermann.buerstmayr@boku.ac.at



## Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) improvement for the production conditions of Kosovo

Salih Salihu<sup>1,2\*</sup>, Heinrich Grausgruber<sup>1</sup>, Shukri Fetahu<sup>2</sup>,  
Imer Rusinovci<sup>2</sup>, Sonja Ivanovska<sup>3</sup> and Hans-Peter Kaul<sup>1</sup>

### Abstract

Winter wheat production in Kosovo relies on varieties which were selected and released in foreign countries. Therefore, the currently cultivated varieties are not best adapted to fluctuations in the prevailing growing conditions. The objective of the present work was to estimate agronomic and quality traits of new wheat breeding lines and check cultivars. Within check cultivars the best performance for grain yield, grain mass and hectolitre weight exhibited cultivars Pobeda and Luna from Serbia and Croatia, respectively, whereas for protein content, SDS sedimentation, loaf volume and dough rheological traits the best performance was observed for the Austrian cultivars Brutus and Justus. Concerning the new germplasm breeding line 24/O/31.04.4 shows a very solid performance over all traits with extremely high protein contents. The other lines with good overall performance were 66/O/31.15.5, 125/O/28.07.4 and 142/C/22.27.1 which showed intermediate or inferior performance in only one of the investigated traits. Line L1 which was selected as single plant off-type from a Kosovan wheat field did not show acceptable overall performance but was satisfying only in regard to grain yield. Generally, concerning the new breeding lines their variability demonstrated that the currently grown check cultivars can be outperformed in all traits. Hence, selection in the present material should be successful to improve the present wheat material in the nearest future.

### Keywords

Baking test, dough rheology, micro scale testing, loaf volume, yield

### Introduction

Common wheat (*Triticum aestivum* L.) is the most important food crop in the world for the production of leavened bread and associated products. Approximately 70 000-90 000 ha of winter wheat are planted annually in Kosovo. The national wheat production with average yields of 2500-3000 kg ha<sup>-1</sup> does not guarantee Kosovan self-supply, i.e. wheat for human consumption has to be imported. The limiting

factor for wheat production is drought at different growth stages and unstable winter conditions. Up to now wheat cultivars grown in Kosovo were originally released in other, often neighbouring countries. Selection of these cultivars was at no time carried out at the specific production constraints predominating in Kosovo. As a first step to improve wheat production a set of international wheat cultivars and breeding lines were tested from 2000 to 2002 (SALIHU et al. 2006). This work was focused on the identification of wheat germplasm with a high potential for high quality and stable yields under conditions of Kosovo agriculture. In the following specific crosses from the BOKU wheat breeding programme were selected for testing in Kosovo. The present work gives first results of the agronomic and quality performance of the new breeding lines compared to check cultivars.

### Material und methods

49 winter wheat breeding lines (F<sub>3:7</sub>) were grown in 2008 alongside with 5 check cultivars, i.e. Pobeda (Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad, Serbia), Lenta, Luna (Agrigenetics d.o.o., Osijek, Croatia), Justus and Brutus (Saatbau Linz, Linz, Austria), which were the predominant winter wheat cultivars in recent years. Check cultivars were replicated throughout the field, whereas breeding lines were arranged in plots within crossing blocks. A representative square meter per entry was harvested by hand and threshed by a stationary thresher (Wintersteiger, Ried, Austria). Protein content was determined by near-infrared transmittance spectroscopy (Infratec Food and Feed Analyzer 1255, Tecator AB, Höganäs, Sweden). Dough mixing characteristics were determined on 10 g flour samples using a Promylograph T3 apparatus (Max Egger, St. Blasen, Austria). Dough extension tests on a micro-scale were performed using a TA.XT2i texture analyzer (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Surrey, UK) equipped with the Kieffer dough and gluten extensibility rig (SMEWING 1995). Analysis of the extension curves was carried out as described by GRAUSGRUBER et al. (2002) with the modification that dough was mixed to optimal consistency by the Promylograph apparatus. SDS-sedimentation test was determined according to DICK and QUICK (1983) using

<sup>1</sup> Department of Applied Plant Sciences and Plant Biotechnology, BOKU–University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Gregor-Mendel-Straße 33, A-1180 VIENNA

<sup>2</sup> Faculty of Agriculture and Veterinary, University of Prishtina, Boulevard Bill Clinton, 10000 PRISHTINA, Kosovo

<sup>3</sup> Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty for Agricultural Sciences and Food, SS Cyril and Methodius University, Bul Aleksandar Makedonski, 91000 SKOPJE, Macedonia (FYR)

\* Ansprechpartner: Dr. Salih SALIHU, salih.salihu@boku.ac.at

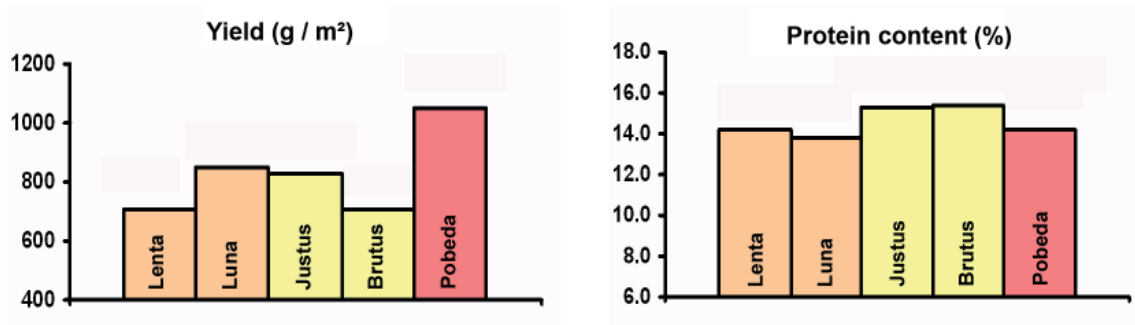


Figure 1: Mean yield and protein content performance of check cultivars

1 g whole-meal flour, milled with a Cyclotec mill equipped with a 1 mm sieve. Baking tests on a micro-scale (SHOGRÉN and FINNEY 1984) were used to describe loaf volume and colour, and crumb texture. Performances in yield, 1000 kernel weight (grain mass), hectolitre (test) weight, protein content, sedimentation volume, extensograph quality defined as KEZ according to GRAUSGRUBER et al. (2002), mixing quality defined as Promylograph quality number according to SALIHU et al. (2006) and baking (loaf) volume were transformed into relative values by setting the respective highest performance as 100 (concept of floating checks; JENSEN 1976). With these relative values star plots were created with SAS 9.1 software to display the multivariate data (FRIENDLY 1991).

## Results

Among check cultivars Pobeda and Luna exhibited the best performance for most agronomic parameters (grain yield, grain mass and hectolitre weight). For protein content and other quality parameters (mixing and extension characters, loaf volume, SDS sedimentation) the best performance was observed for the Austrian cultivars Brutus and Justus Austria (Figure 1). Overall variability of check cultivars and breeding lines for yield, protein content, mixing and extension quality is demonstrated in Figure 2. Average grain yield of the checks was 8228 kg ha<sup>-1</sup>, whereas new breeding lines yielded 8871 kg ha<sup>-1</sup>. Concerning quality traits the majority of the breeding lines outperformed the check cultivars. Especially significant was the outperformance for

parameters related to dough extensibility measured by the micro extensograph.

Studying the star plots of the single genotypes the multivariate performance becomes more highlighted. Check cultivar Pobeda shows good performance in regard to yield, grain mass, test weight and sedimentation volume, however, is inferior concerning baking volume (Figure 3). Compared to Pobeda the other two widely grown cultivars from Novi Sad, i.e. Europa and Renesansa, are inferior in their performance with the exception of the high loaf volume realized by Europa. The Austrian cultivar Brutus shows excellent performance in almost all traits, however, is inferior in grain yield and intermediate in baking volume. Concerning the new germplasm breeding line 24/O/31.04.4 shows a very solid performance over all traits with extremely high protein contents. The other lines with good overall performance were 66/O/31.15.5 (inferior in grain mass), 125/O/28.07.4 (intermediate in dough extension test) and 142/C/22.27.1 (inferior in test weight). Line L1 which was selected as single plant off-type from a Kosovan wheat field did not show acceptable overall performance but was satisfying only in regard to grain yield.

## Discussion

From the wheat cultivars currently grown in Kosovo Pobeda seems to be best adapted for the realization of high yields. Pobeda was selected and released by the Institute of Field and Vegetable Crops in Novi Sad (Serbia), a region where similar climatic conditions can be supposed. Other cultivars

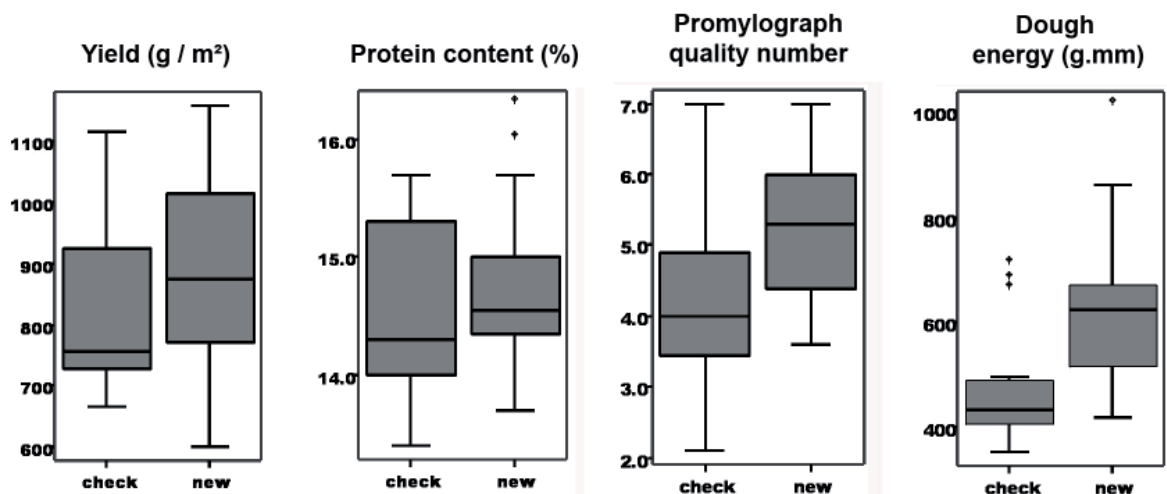


Figure 2: Variation in selected agronomic and quality traits of check cultivars and new breeding lines

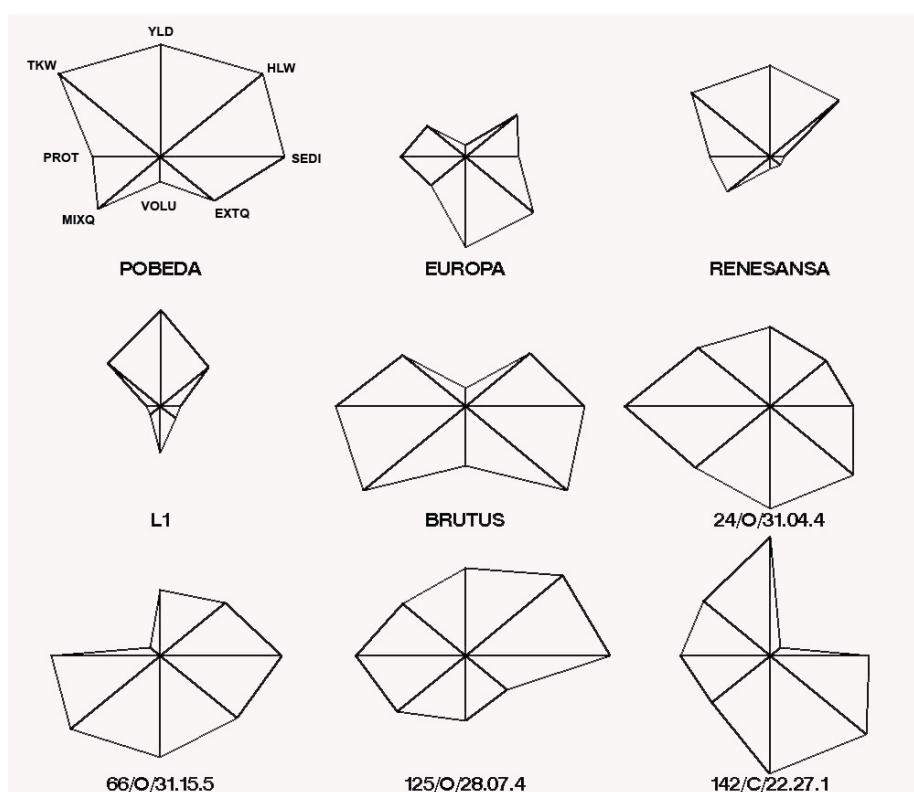


Figure 3: Star plots of check cultivars and selected breeding lines. The length of each ray is proportional to the size of that variable (YLD, grain yield; TKW, grain mass; HLW, test weight; PROT, protein content; SEDI, sedimentation volume; MIXQ, mixing quality; EXTQ, extensograph quality; VOLU, baking volume)

from the same breeder, e.g. Europa and Renesansa, however, were generally inferior to Pobeda, which supports the necessity for testing and selection under the specific conditions of Kosovo. Cultivars introduced from Austria exhibited high levels of diverse quality traits, however, missed grain yield. Yield levels in the experiment were significantly higher than average wheat yields in Kosovo. This is due to many reasons. First no yield loss occurred in the experiment since harvest was carried out by hand and at optimal time. Moreover, only a representative square meter was harvested and the experiment obtained optimal treatment. In practical Kosovan agriculture, however, significant yield losses occur due to poor seed quality (e.g. low germination capacity and low seedling vigour), inferior seedbed preparation, low input of fertilizers and weed control, and grain losses by old combine harvester technology. Concerning the new breeding lines their variability demonstrated that the check cultivars can be outperformed in all traits. Some breeding lines already revealed solid outperformance for multivariate observations. Hence, selection in the present material should be successful to improve the present wheat material in the nearest future. Therefore, significant improvements can be expected for Kosovo wheat production in the near future which should contribute to wheat self-sufficiency.

## Acknowledgements

S. Salihu gratefully acknowledges financial support from the Austrian Sciences and Research Liaison Office (ASO) and Saatzucht Donau, Probstdorf, for providing lab facilities.

## References

- DICK JW, QUICK JS, 1983: A modified screening test for rapid estimation of gluten strength in early generation durum wheat breeding lines. *Cereal Chem* 60, 315-318.
- FRIENDLY M, 1991: SAS® System for Statistical Graphics, 1st Ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- GRAUSGRUBER H, SCHÖGGL G, RUCKENBAUER P, 2002: Investigation on the validity of the micro-extensograph method to measure rheological properties of wheat dough. *Eur Food Res Technol* 214, 79-82.
- JENSEN NF, 1976: Floating checks for plant breeding nurseries. *Cereal Res Commun* 4, 285-295.
- SALIHU S, GRAUSGRUBER H, RUCKENBAUER P, 2006: Agronomic and quality performance of international winter wheat genotypes grown in Kosovo. *Cereal Res Commun* 34, 957-964.
- SHOGREN MD, FINNEY KF, 1984: Bread making test for 10 grams of flour. *Cereal Chem* 61, 418-423.
- SMEWING J, 1995: The measurement of dough and gluten extensibility using the SMS/Kieffer rig and the TA.XT2 texture analyser. Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Surrey, UK.

## Gene expression analysis of related wheat lines with contrasting levels of head blight resistance after *Fusarium graminearum* inoculation

Barbara Steiner<sup>1\*</sup>, Apinun Limmongkon<sup>1</sup>, Katharina Schiessl<sup>1</sup>, Marc Lemmens<sup>1</sup>, Haiyan Jia<sup>3</sup>, Gary Muehlbauer<sup>3</sup>, Alexandra Posekany<sup>2</sup>, David Philip Kreil<sup>2</sup> and Hermann Buerstmayr<sup>1</sup>

### Abstract

Eight spring wheat genotypes with contrasting phenotypes for *Fusarium* head blight (FHB) resistance were used in this study: the highly resistant line CM82036, the highly susceptible cultivar Remus, four BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub> near isogenic lines (NILs) for *Fhb1* and *Qfhs.ifa-5A* and two doubled haploid (DH) lines from a CM82036/Remus mapping population differing in *Fhb1* and *Qfhs.ifa-5A*. At anthesis the flowering heads of the plants were single floret inoculated by *F. graminearum* or water. The inoculated spikelets were harvested at several time points after inoculation and dissected into the generative and vegetative parts for RNA preparation. Differential gene expression was monitored with two complementary methods: 1) cDNA-AFLPs and 2) the Affymetrix wheat

GeneChip. At early time points (8-24 h) after inoculation only few genes were differentially expressed, at later time points (48-72 h) after inoculation an increasing number of differentially expressed transcripts was evident. A comparative analysis of the data on identified candidate genes gained by the two complementary approaches will be presented.

### Keywords

cDNA-AFLP, gene expression, microarray, transcriptomics, *Triticum aestivum*

### Acknowledgments

We acknowledge funding of this work by FWF (Austrian Science Fund), project numbers: P16724-B05 and F3711-B11, and the Federal State of Lower Austria.

<sup>1</sup> BOKU, University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Department IFA-Tulln, Institute for Biotechnology in Plant Production Konrad-Lorenz-Straße 20, A-3430 TULLN

<sup>2</sup> BOKU, University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Department of Biotechnology, Vienna Science Chair of Bioinformatics, Muthgasse 18, A-1190 VIENNA

<sup>3</sup> University of Minnesota, Department of Agronomy and Plant Genetics, 411 Borlaug Hall 1991 Upper Buford Cir. 55108-6026, St. PAUL, MN, USA

\* Ansprechpartner: Barbara STEINER, barbara.steiner@boku.ac.at

# Ertragsleistungen von Ölkürbis-Sorten in Praxisversuchen Yield performance of oil seed pumpkin in on-farm variety trials

Viktoria Neubauer<sup>1</sup>, Anton Brandstetter<sup>2</sup> und Johann Vollmann<sup>1\*</sup>

## Abstract

In oil seed pumpkin, the implementation of cultivar seed yield trials is laborious due to the vining growth habit of pumpkin requiring very large plots. Thus, the number of regional yield trial results available for cultivar recommendation is rather limited. On-farm oil pumpkin yield trials were therefore carried out in large plots of 0.5 ha plot size with a limited number of unreplicated genotypes using standards and unbalanced designs in order to compare the performance of open-pollinated cultivars and hybrid varieties in Lower Austria. In the 2009 season, cultivar differences in fruit rotting were not associated with the date of flowering of female flowers; significant variation between cultivars was found in fruit weight and seed percentage of fruit, and the highest seed yield was achieved by a cultivar with low fruit weight but high seed percentage of fruit and large number of fruits per unit area. In a combined analysis of unbalanced yield data from ten cultivars grown across eight environments, similar estimates of yield performance were obtained by either fixed or mixed model analysis of variance. Yield performance of superior hybrid cultivars was in the range between 750 and 1070 kg/ha, whereas seed yield of widely-used open-pollinated pumpkin cultivars was between 600 and 700 kg/ha.

## Keywords

*Cucurbita pepo*, mixed model analysis, seed yield, unbalanced data, yield components

## Einleitung

Bei der Züchtung von Steirischem Ölkürbis (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* var. *styriaca*) steht derzeit neben der Selektion auf Resistenz gegen das Zucchini-Gelbmosaikvirus (PACHNER und LELLEY 2009) sowie die Kürbis-Fruchtfäule (WINKLER et al. 2009) und der bei Ölkürbis nach Einkreuzungen ständig erforderlichen Auslese auf Dünnschaligkeit der Samen (LELLEY et al. 2009) auch eine Sortenumstellung von offen bestäubten Populationsorten zu Hybridsorten im Mittelpunkt der Aktivitäten. Dies bedingt für die Praxis einen Sortenwechsel von den traditionell angebauten Populationen zu leistungsfähigeren Neuzüchtungen, womit auch ein höherer Prüfaufwand seitens der Anbauberatung gegeben ist. Leistungsprüfungen bei Ölkürbis sind aber sehr aufwendig, da bedingt durch

den Wuchstyp mit Ranken von bis zu 10 m Länge sehr große Parzellen erforderlich sind und die Versuchsernte nur teilweise mechanisierbar ist. Praxisversuche der niederösterreichischen Landwirtschaftskammer werden daher an verschiedenen Standorten in Form von Standardanlagen bei einer Parzellengröße von 0.5 ha durchgeführt und erbringen wertvolle Informationen für die Sortenwahl in einzelnen Anbauregionen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, neben der Bestimmung des Ertragsaufbaus einzelner Sorten und des Auftretens von Fruchtfäule auch die nicht-orthogonalen Sorten-Ertragsversuche auf Praxisbetrieben über acht Umwelten gemeinsam auszuwerten, wobei neben Varianzanalysemodellen mit fixen Effekten verschiedene Modelle mit gemischten Effekten getestet und genotypische Ertragsschätzwerte ermittelt wurden.

## Material und Methoden

Die ertragsanalytischen Untersuchungen wurden an Großparzellen mit vier Sorten auf dem Betrieb Neubauer am Standort Pernersdorf 2009 durchgeführt, wobei Flächen von jeweils 25m<sup>2</sup> hinsichtlich der Blühmerkmale, der Ertragskomponenten und des Fruchtfäulebefalls vollständig ausgewertet wurden. Die untersuchten Sorten waren die offen abblühenden Populationsorten Gleisdorfer Ölkürbis und Retzer Gold, der Dreivegehybrid Opal und der Einfachhybrid Maximal. Für die Ertragsanalysen wurde ein unbalanziertes Datenset mit insgesamt zehn Sorten über acht Umwelten (*Tabelle 1*) herangezogen, Daten von zwei Standard-Sorten (Gleisdorfer Ölkürbis, Retzer Gold) waren über alle Umwelten vorhanden. Die Einzelversuche waren jeweils als Standardanlage mit einer Parzellengröße von 0.5 ha angelegt. Die Modellierung der Ertragsdaten (siehe *Tabelle 1*) wurde mittels des Statistikpaketes SAS (Vers. 9.1, Procedures GLM und MIXED) wie folgt durchgeführt:

GLM: Genotypen, Umwelten fix,  
GxU-Interaktion als Fehlerterm, LS means

MIXED1: Genotypen fix, Umwelten zufällig

MIXED2: Genotypen fix, Umwelten, GxU zufällig

MIXED3: Genotypen fix, Umwelten, GxU zufällig,  
Kovarianzparameter vorgegeben, EBLUES

MIXED4: Genotypen, Umwelten, GxU zufällig, BLUPs

## Ergebnisse und Diskussion

Auf dem Standort Pernersdorf trat 2009 im Vergleich zu anderen Umwelten wenig Fruchtfäule auf, Sortenunterschie-

<sup>1</sup> Universität für Bodenkultur Wien, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Gregor Mendel Straße 33, A-1180 WIEN

<sup>2</sup> Landwirtschaftskammer Niederösterreich, Fachabteilung Pflanzenproduktion, Wiener Straße 64, A-3100 ST. PÖLTEN

\* Ansprechpartner: Dr. Johann VOLLMANN, johann.vollmann@boku.ac.at

**Tabelle 1: Schätzwerte der Kern-Erträge (kg/ha) und deren Standardfehler (std.err.) für 10 Ölkürbissorten aus nicht-orthogonalen Praxisversuchen auf Großparzellen (0.5 ha Parzellengröße, 8 Umwelten aus 5 Anbaujahren in Niederösterreich) in Abhängigkeit von der varianzanalytischen Modellierung**

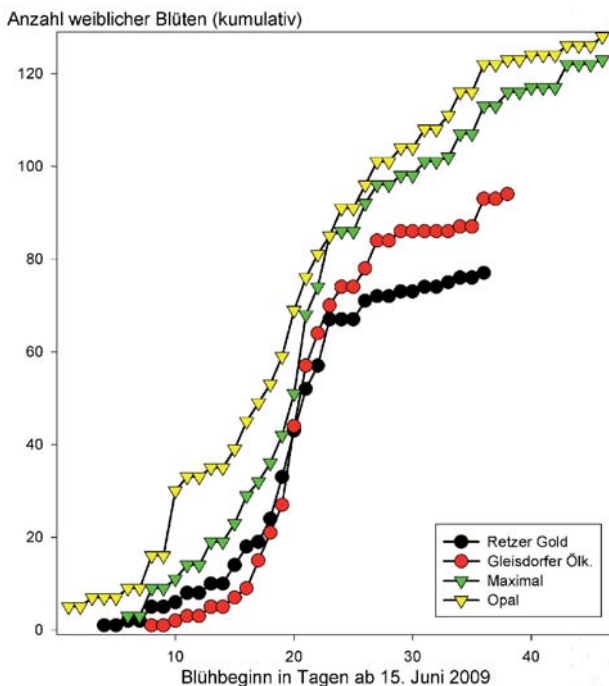
Table 1: Estimates of pumpkin seed yield (kg/ha) and the respective standard errors (std. err.) for 10 oil seed pumpkin cultivars calculated from non-orthogonal on-farm trials on large plots (plot size 0.5 ha, 8 environments across 5 years in Lower Austria) as influenced by the statistical modelling

Nr. Sorte	Prüf- Umwelten	Parz. insges.	GLM LSMEANS	std. err.	MIXED1 LSMEANS	std. err.	MIXED2 LSMEANS	std. err.	MIXED3 LSMEANS	std. err.	MIXED4 BLUP means	std. err.
1 Gl. Diamant	5	5	627	68	610	84	591	89	596	90	623	82
2 Gl. Express	4	4	664	78	661	92	658	99	661	99	675	87
3 Gl. Extra	1	1	430	156	424	162	416	189	415	184	581	119
4 Gl. Kristall	2	2	637	110	624	120	597	137	599	134	634	104
5 Gl. Magnet	2	2	512	114	537	122	555	137	550	134	614	104
6 Gl. Maximal	2	2	742	112	759	121	792	139	788	135	718	104
7 Gl. Opal	4	4	1062	78	1064	92	1067	99	1066	99	940	87
8 Gleisdorfer Ölkürbis	8	8	634	51	634	72	634	73	634	74	641	71
9 HSC 151	2	2	623	110	592	120	568	137	577	134	629	104
10 Retzer Gold	8	19	677	35	669	61	678	72	678	74	678	70

de waren dennoch signifikant, Opal zeigte den geringsten, Gleisdorfer Ölkürbis ähnlich wie bei WINKLER et al. (2009) den stärksten Befall. Der Blühverlauf der untersuchten Sorten war deutlich unterschiedlich (Abbildung 1), trotzdem standen dieser und auch die Niederschlagsverteilung zur Blüte nicht in einem Zusammenhang mit dem Fäuleauftreten. Dagegen hatte der Blühbeginn der weiblichen Blüte einen Einfluss auf das Kürbisgewicht und die 100-Kern-Masse (Abbildung 2). Es bestanden zwischen den vier Sorten signifikante Unterschiede in Fruchtgewicht und Kern-Anteil (Abbildung 3), die Hybride Opal und Maximal wiesen geringere Fruchtgewichte als Retzer Gold auf, aber einen höheren Kernanteil (Abbildung 3). Die hohen Samenerträge von Opal (siehe auch Tabelle 1) auf dem

Standort Pernersdorf im Jahr 2009 kamen dagegen durch die wesentlich höhere Fruchtanzahl pro Flächeneinheit im Vergleich zu den anderen Sorten zustande. Aus Abbildung 3 ist auch ersichtlich, dass die Variation in Fruchtmerkmalen bei dem Dreibegehybrid Opal ähnlich hoch wie bei den Populationen Retzer Gold bzw. Gleisdorfer Ölkürbis war, wogegen der Einfachhybrid Maximal wesentlich homogenere Fruchtmerkmale aufwies.

Die varianzanalytische Auswertung der Erträge von Großparzellen über acht Umwelten ergab in allen untersuchten Modellen signifikante Sorten- und Umweltunterschiede. Genotyp x Umwelt-Interaktionen waren, soweit im Modell berücksichtigt, ebenfalls signifikant. Die vom Modell abhängigen Sortenmittelwerte sind in Tabelle 1 wiedergegeben, LS-means der GLM-Varianzanalyse und BLUP-means (MIXED4, Modell mit ausschließlich zufälligen Effekten) weisen die geringsten Standardfehler auf. Abbildung 4 zeigt, dass die Rangreihung der Genotypen auch bei unterschiedlicher Modellierung weitgehend erhalten bleibt. Eine gemeinsame Auswertung derartiger Großparzellenversuche über verschiedene Umwelten erscheint daher bei Vorhandensein durchgehender Standardsorten als durchaus sinnvoll und kann interessante Ergebnisse über das Sortenverhalten unter Praxisbedingungen liefern, wie auch in ähnlichen Untersuchungen an unbalancierten Datensätzen unter Einsatz von REML-Schätzungen und gemischten Modellen gezeigt wurde (VIRK et al. 2009). Von den getesteten Sorten lagen die Hybridsorten Opal und Maximal im Kernertrag teils erheblich über den älteren Populationssorten Gleisdorfer Ölkürbis und Retzer Gold (Tabelle 1), was in guter Übereinstimmung zu den Ergebnissen amtlicher Wertprüfungen steht (BUNDESAMT f. ERNÄHRUNGSSICHERHEIT 2009).



**Abbildung 1: Blühverlauf weiblicher Blüten bei vier Ölkürbissorten (Pernersdorf 2009)**

Figure 1: Progress of female flowering in four oil seed pumpkin cultivars at Pernersdorf in 2009

## Danksagung

Die Autoren danken den an den Ölkürbis-Streifenversuchen der niederösterreichischen Landwirtschaftskammer teilnehmenden Landwirten für die Durchführung der jeweiligen Versuche. Herrn Prof.Dr. Heinrich Grausgruber (BOKU Wien) gebührt ein Dank für die statistische Modellierung der Ertragsdaten.

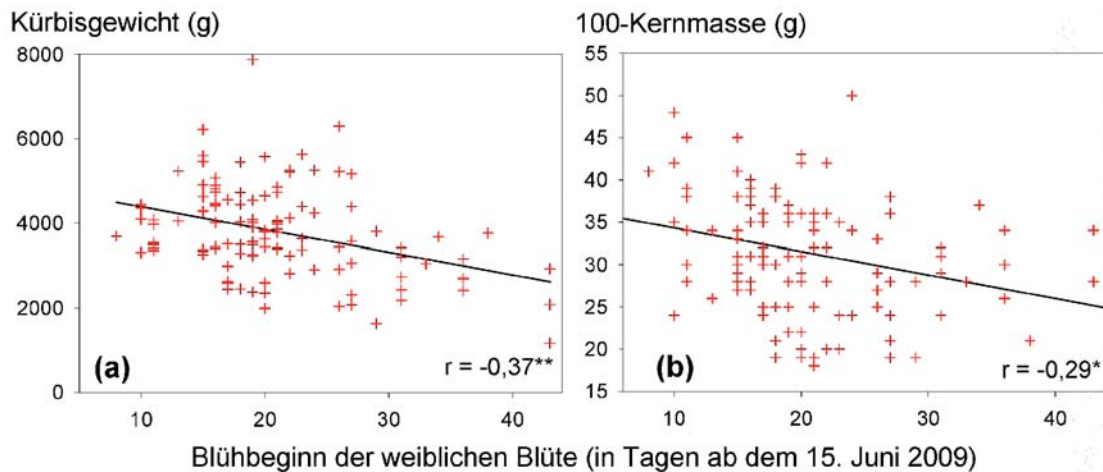


Abbildung 2: Beziehung zw. Blühbeginn einzelner Blüten und Kürbisgewicht (a) bzw. 100-Kernmasse (b) bei 4 Sorten (Pernersdorf 2009)

Figure 2: Relationship between date of flowering for individual female flowers and (a) pumpkin fruit fresh weight and (b) 100-seed weight, respectively, in four genotypes at Pernersdorf in 2009

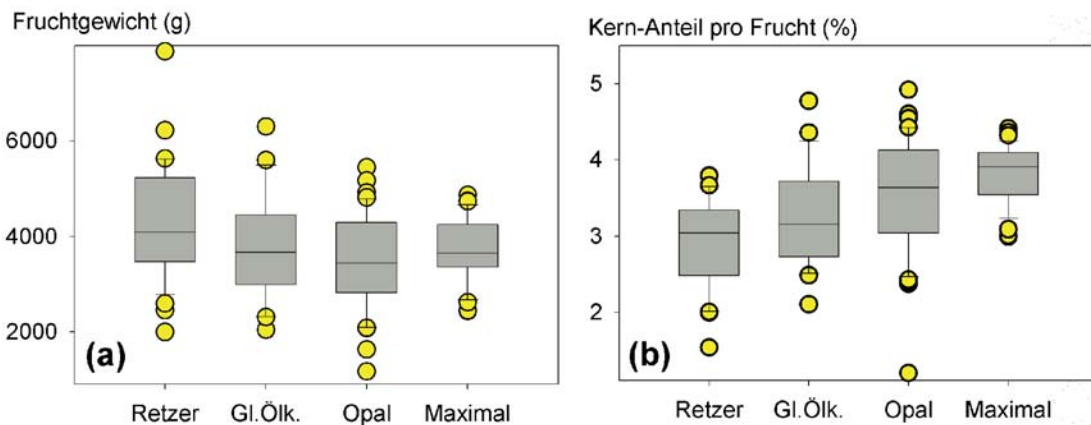


Abbildung 3: Variation des Fruchtgewichtes (a) bzw. Kern-Anteils (Kern-TM in % des Fruchtgewichtes) (b) von vier Ölkürbissorten (Pernersdorf 2009)

Figure 3: Variation in (a) pumpkin fruit fresh weight and (b) seed proportion of fruit (seed dry matter in % of fruit fresh weight) in four genotypes at Pernersdorf in 2009

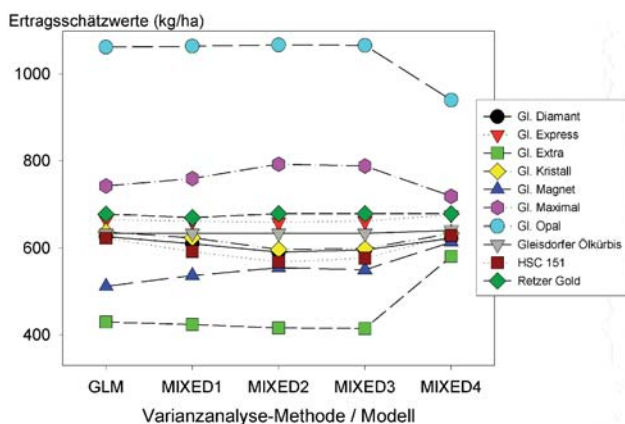


Abbildung 4: Vergleich der Ertragsschätzwerte der einzelnen Ölkürbissorten bei unterschiedlicher varianzanalytischer Modellierung

Figure 4: Comparison of yield estimates for 10 oil seed pumpkin cultivars as influenced by statistical data modelling

## Literatur

- BUNDESAMT für Ernährungssicherheit, 2009: Österreichische Beschreibende Sortenliste, Ölkürbis [Available online: <http://www.ages.at/ages/landwirtschaftliche-sachgebiete/sorte/>; accessed 15 Nov. 2009].
- LELLEY T, LOY B, MURKOVIC M, 2009: Hull-less oil seed pumpkin. In: Vollmann J, Rajcan I (eds), Oil crops, 469-492. Handbook of Plant Breeding, Vol 4. Springer, New York.
- PACHNER M, LELLEY T, 2009: Pyramiding von Resistenzgenen gegen das Zucchini Gelbmosaikvirus in Ölkürbis (*Cucurbita pepo*). Bericht 59. Tagung 2008 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 81-84. LFZ Raumberg-Gumpenstein, Irnding.
- VIRK DS, PANDIT DB, SUFIAN MA, AHMED F, SIDDIQUE MAB, SAMAD MA, RAHMAN MM, ISLAM MM, ORTIZ-FERRARA G, JOSHI KD, WITCOMBE JR, 2009: REML is an effective analysis for mixed modelling of unbalanced on-farm varietal trials. *Expl Agric* 45, 77-91.
- WINKLER J, FREISTETTER B, HUSS H, 2009: Sortenabhängige und zeitliche Entwicklung von Fruchtfäule bei Ölkürbis (*C. pepo* var. *styriaca*). Bericht 59. Tagung 2008 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 137-138. LFZ Raumberg-Gumpenstein, Irnding.