

Vereinigung der Pflanzzüchter  
und Saatgutkaufleute Österreichs

# 62. Tagung

**22.-23. November 2011**

Von markergestützter Selektion  
zu genomischer Selektion  
in der Pflanzenzüchtung

Wheat stress und Robust Wheat

Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt  
für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein

## **Impressum**

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

#### *Herausgeber*

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

*Für den Inhalt verantwortlich*  
die Autoren

#### *Redaktion*

Dr. Anton Brandstetter, Manuela Geppner  
Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs  
  
a.o.Univ.Prof. Dr. Heinrich Grausgruber  
Universität für Bodenkultur Wien  
  
Univ.Doiz. Dr. Karl Buchgraber  
Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein (LFZ)

#### *Layout*

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

#### *Druck, Verlag und © 2012*

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

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

## Vorwort

Dr. Michael Gohn<sup>1\*</sup>

### Sehr geehrte Damen und Herren!

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

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

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

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

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

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

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

---

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

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



# Inhaltsverzeichnis

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

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

## Genomic Selection: Promise, experience, expectation

Johann Sölkner<sup>1</sup>, Birgit Gredler<sup>1</sup>, Hermann Schwarzenbacher<sup>2</sup>, Johann Tanzler<sup>3</sup>,  
Anamarija Frkonja<sup>1</sup>, Gabor Meszaros<sup>1</sup> and Christa Egger-Danner<sup>2</sup>

### Abstract

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

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

### Keywords

Animal breeding, Fleckvieh, genomic selection, Simmental

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

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

<sup>3</sup> Arbeitsgemeinschaft österreichischer Fleckviehzüchter, Pater Werner Deibl Straße 4, A-3910 ZWETTL

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





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

Theresa Albrecht und Chris-Carolin Schön<sup>1\*</sup>

## Abstract

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

## Keywords

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

## Einleitung

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

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

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

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

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

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

<sup>1</sup> Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, TU München, Emil-Ramann-Straße 4, D-85354 FREISING

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

## Material und Methoden

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

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

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

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

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

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

## Vorhersage der Testkreuzungsleistung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Kreuzvalidierung

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

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

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

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

## Ergebnisse und Diskussion

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

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

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

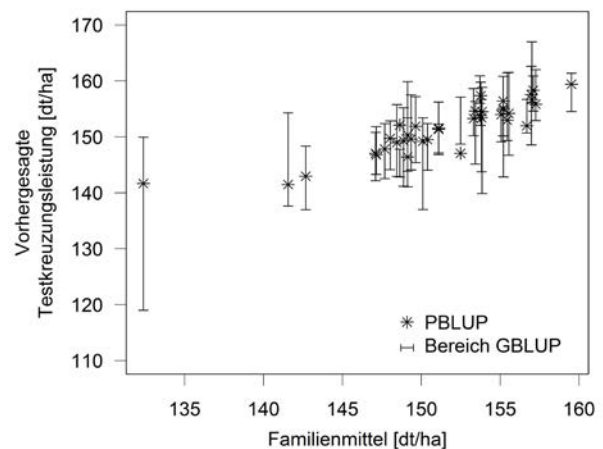
**Table 2: Average predictive abilities of three models for the traits grain dry matter yield (KE) and grain dry matter content (KTMG) evaluated with 50 cross-validation runs based on sampling within (CV-W) and across families (CV-A) of the VC1 data set**

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

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

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

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



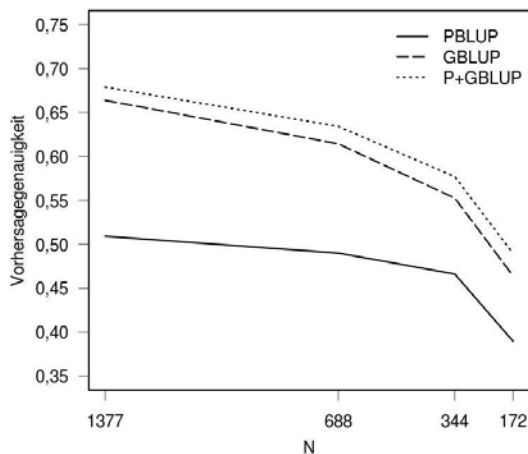
**Abbildung 1: Vorhergesagte Testkreuzungsleistung mit PBLUP sowie der mit GBLUP vorhergesagte Wertebereich eines TS aus CV-W gegen das jeweilige Familienmittel für das Merkmal Kornertrag im Datensatz VC1**

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

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

## Schlussfolgerung

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



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

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

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

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

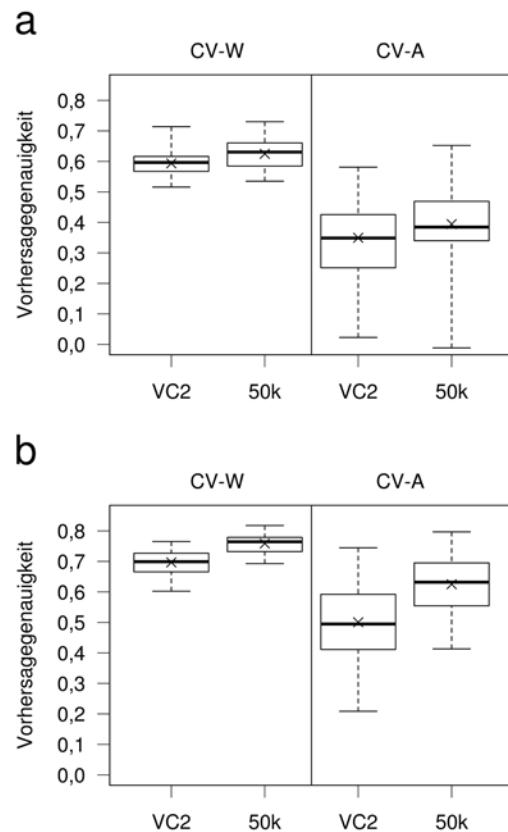
## Danksagung

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

## Literatur

ALBRECHT T, WIMMER V, AUINGER HJ, ERBE M, KNAAK C, OUZUNOVA M, SIMIANER H, SCHÖN CC. 2011: Genome-based prediction of testcross values in maize. *Theor Appl Genet* 123: 339-350.

GANAL MW, DURSTEWITZ G, POLLEY A, BÉRARD A, BUCKLER ES, CHARCOSSET A, CLARKE JD, GRANER EM, HANSEN M,



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Maria Buerstmayr<sup>1\*</sup>, Marc Lemmens, Barbara Steiner and Hermann Buerstmayr

## Abstract

While many reports on genetic analysis of Fusarium head blight (FHB) resistance in bread wheat have been published during the past decade, only limited information is available on FHB resistance derived from wheat relatives. In this contribution we report the genetic analysis of FHB resistance derived from *Triticum macha* (Georgian spelt wheat). As the origin of *T. macha* is in the Caucasian region, it is supposed that its FHB resistance differs from other well-investigated resistance sources. In order to introduce valuable alleles from the landrace *T. macha* into a modern genetic background we adopted an advanced back-cross QTL mapping scheme (TANKSLEY and NELSON 1996). A backcross-derived recombinant-inbred line population of 321 BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> lines was developed from a cross of *T. macha* with the Austrian winter wheat cultivar Furore. The population was evaluated for Fusarium resistance in seven field experiments during four seasons using artificial inoculations. In addition several plant morphological and developmental traits were evaluated, such as plant height, flowering date, and spike morphology. 300 lines of the population were genetically fingerprinted using SSR and AFLP markers. Map construction was done with an updated version of CarthaGène software (De GIVRY et al. 2005). For QTL mapping QGene software (NELSON 1997) was used.

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

## Keywords

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

## Acknowledgments

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

## References

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

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

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

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

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

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

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



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

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

### Abstract

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

### Keywords

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

### Einleitung

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

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

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

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

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

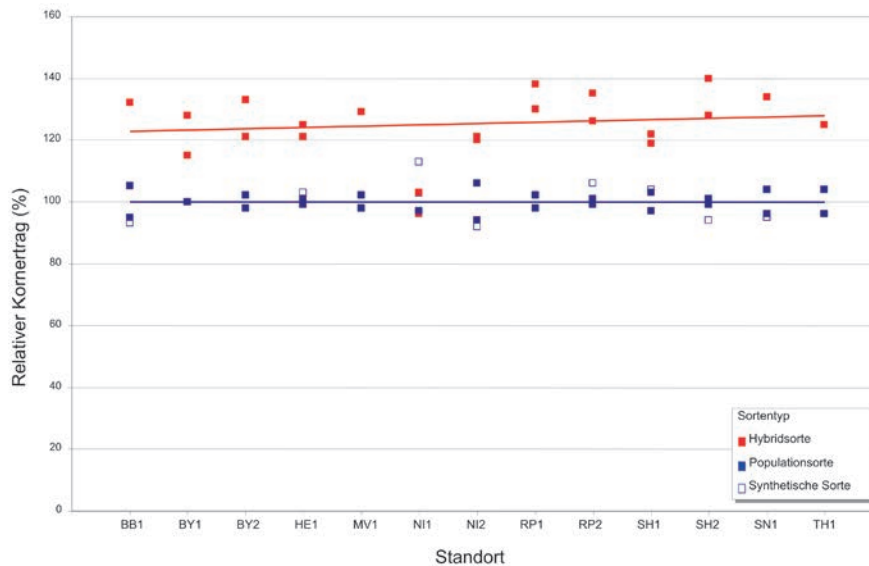
<sup>2</sup> Julius Kühn-Institut, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Rudolf-Schick-Platz 3, D-18190 GROß LÜSEWITZ

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

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

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

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



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

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

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

Die Effizienz von Hybridzüchtungsprogrammen kann durch den Einsatz molekularer Marker zur Vorhersage der Hybridleistung erhöht werden (VUYLSTEKE et al. 2000, YU et al. 2005, SCHRAG et al. 2006, MAENHOUT et al. 2009, FRISCH et al. 2010). Voraussetzung hierfür sind Kenntnisse über Marker, welche für die Ausprägung von züchterisch relevanten, quantitativ vererbten Merkmalen (*quantitative trait loci*, QTL) mitbestimmend sind. Für den Roggen sind bislang nur wenige derartige Marker-Merkmalbeziehungen beschrieben (BÖRNER et al. 1999, 2000; MASOJC und MILCZARSKI 2005, FALKE et al. 2009). Diese QTL-Studien wurden an Kartierungspopulationen aus biparentalen Kreuzungen (F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub>, RIL) durchgeführt. Die Effekte der dabei untersuchten zwei Allele auf die Merkmalsausprägung bedürfen daher der Validierung an den Elitelinien eines Zuchtprogramms. Die auf Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) beruhende Assoziationskartierung stellt einen alternativen Ansatz zur Kartierung von QTL dar. Sie bietet den Vorteil, dass sie direkt an Elitezuchtmaterial durchgeführt und die gewonnenen Erkenntnisse unmittelbar für die kommerzielle Sortenentwicklung genutzt werden können. Darüber hinaus ermöglichen Assoziationsstudien, eine potenziell große Zahl an Allelen je Genort zu evaluieren. Das niedrige LD im Roggen (LI et al. 2011a) verspricht in genomweiten Untersuchungen eine hohe genetische Auflösung. Allerdings kann diese aufgrund der Größe des Roggen-genoms von ca. 8,1 Gb nur über einen erheblichen Genotypisierungsaufwand erreicht werden. Insbesondere

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

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

## Material und Methoden

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



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

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

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

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

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

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

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

## Ergebnisse und Diskussion

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

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

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

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

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

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

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

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

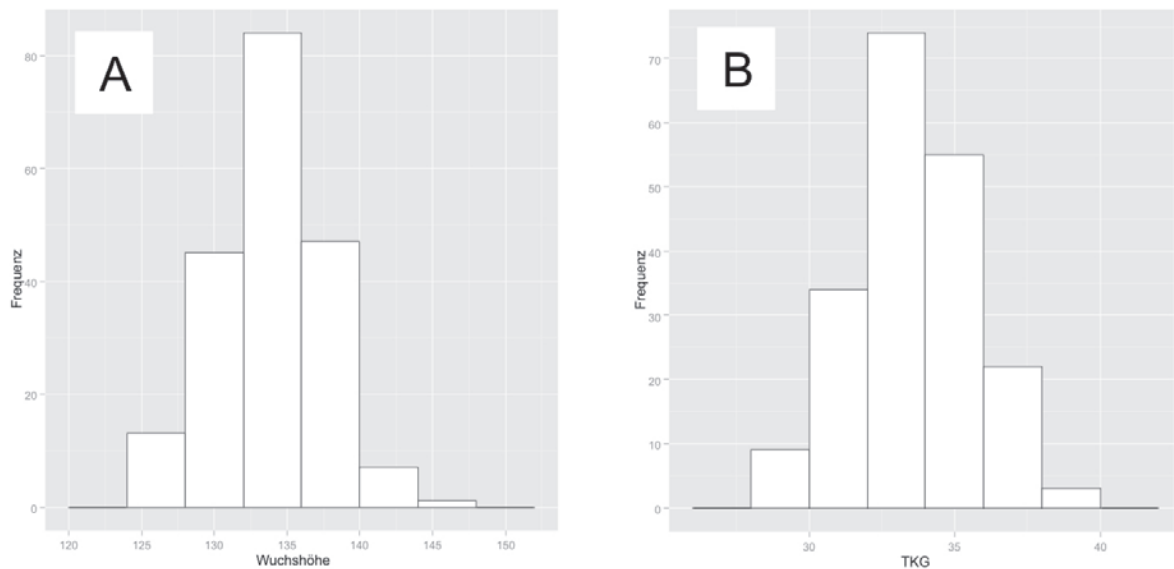


Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung für die Merkmale Wuchshöhe (A) und Tausendkornmasse (B) von 197 Testkreuzungen über multiple Umwelten in 2010

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

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

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

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

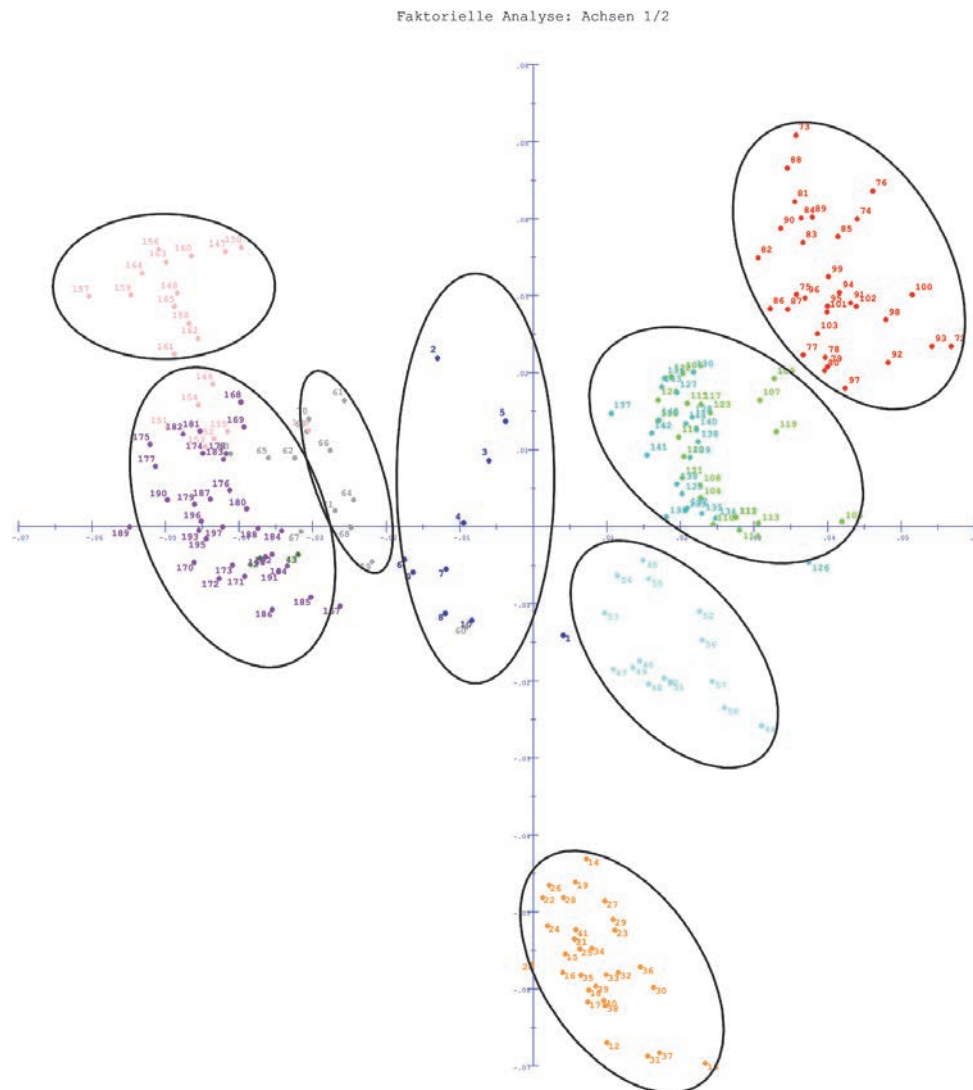
Table 2: Proportion of phenotypic variance ( $V_p$ ) for plant height (WUH, cm) and thousand grain weight (TKG, g) explained by associated markers in case of three significance levels

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

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

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

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

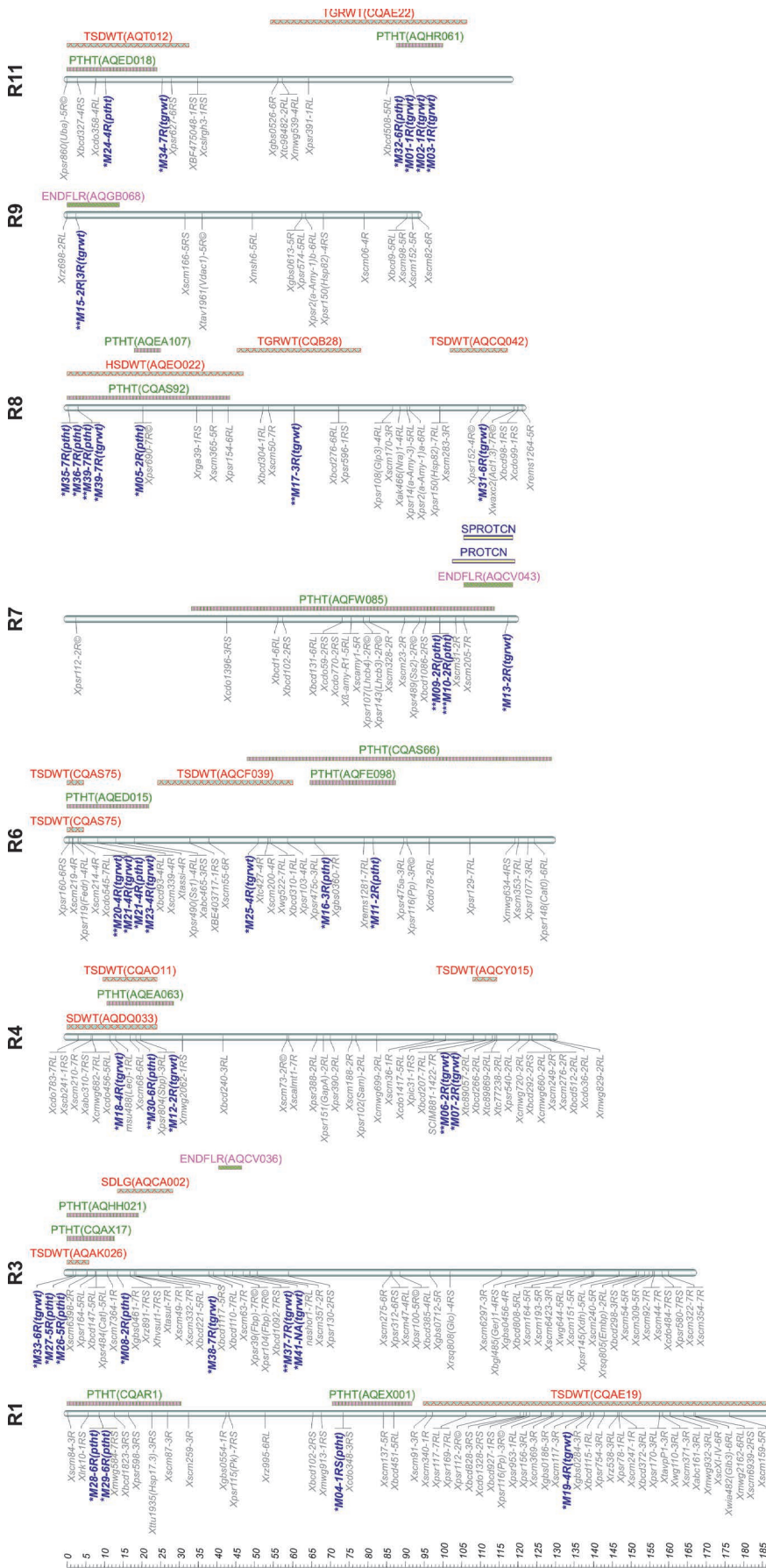


**Abbildung 3: Hauptkoordinatenanalyse von 197 Testkreuzungen.** Eine Einteilung des Untersuchungsmaterials in Populationen basierend auf genetischen Unterschieden wurde mit Hilfe von 3117 DArT-Markern vorgenommen. Der durch diese Darstellung erklärte Anteil an der Gesamtvarianz beträgt 18%.

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

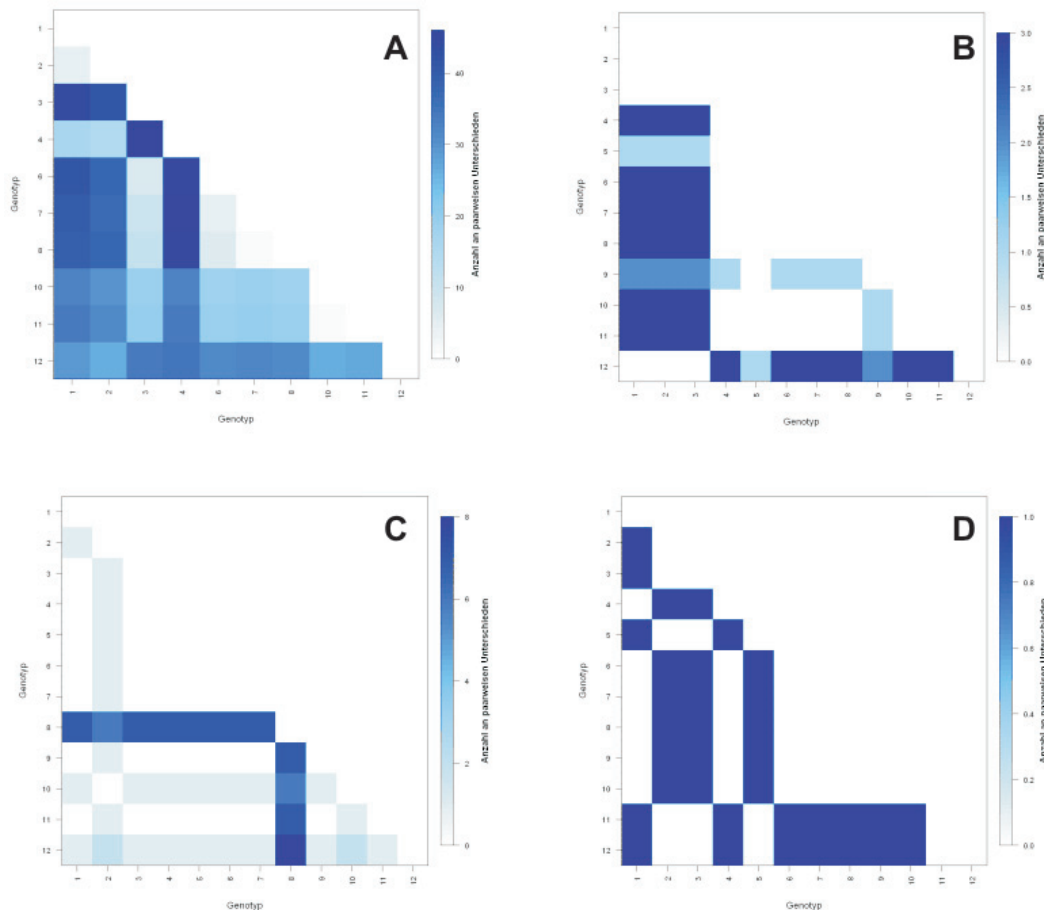
(Abbildung 4). Homologe QTL-Regionen für Wuchshöhe, Korngröße, Reife- und Blütezeitpunkt wurden bereits früher zwischen verschiedenen Arten aus der Familie der Süßgräser (Reis, Mais, Hirse, Gerste und Weizen) beschrieben (LIN et al. 1995, PATERSON et al. 1995). Die Integration relevanter Daten über komplex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

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



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

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



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

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

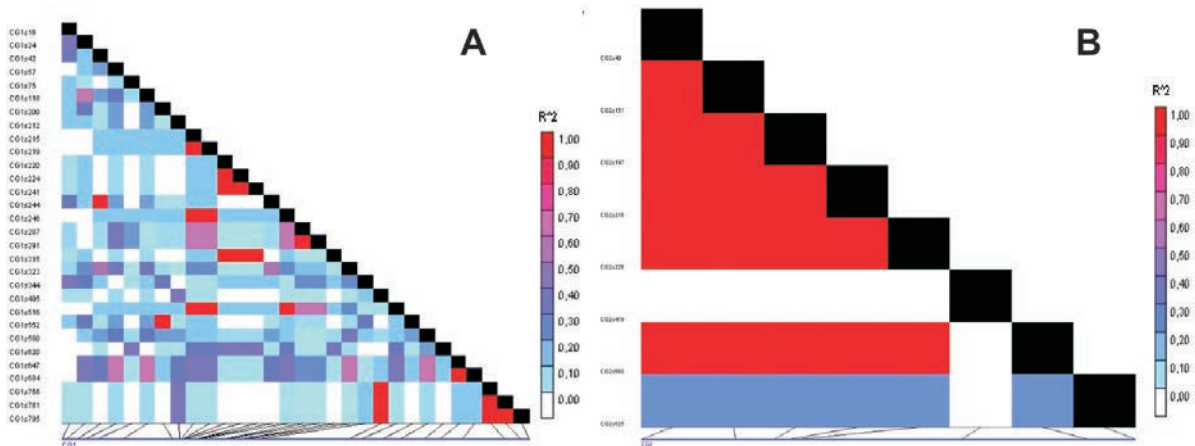
Einfluss auf das Merkmal Kornmasse besitzt (ASHIDA et al. 2009). Für qualitative Merkmale des Roggens haben sich genomische Informationen aus evolutionär verwandten Gräsern als wertvolle Ressource bei der Entwicklung molekularer Marker erwiesen (HACKAUF und WEHLING 2005, MAGO et al. 2005, COLLINS et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

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

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

## Zusammenfassung

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



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

**Figure 6:** Linkage disequilibrium (LD) heat plot of a candidate gene from starch metabolisms (A) and flowering time control pathway (B). Each grid represents the degree of LD estimated by  $R^2$  for each pairwise comparison between polymorphic sites with a minor allele frequency (MAF)  $> 0,05$ . The colour legend for  $R^2$  values is given on the right side.

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

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

## Danksagung

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

## Literatur

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

- plasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. *Genetics* 177: 1889-1913.
- ELSHIRE RJ, GLAUBITZ JC, SUN Q, POLAND JA, KAWAMOTO K, BUCKLER ES, MITCHELL SE, 2011: A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* 6(5):e19379. (DOI:10.1371/journal.pone.0019379).
- EXCOFFIER L, LISCHER HEL, 2010: Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564-567.
- FALKE KC, SUSIĆ Z, WILDE P, WORTMANN H, MÖHRING J, PIEPHO HP, GEIGER HH, MIEDANER T, 2009: Testcross performance of rye introgression lines developed by marker-assisted backcrossing using an Iranian accession as donor. *Theor Appl Genet* 118: 1225-1238.
- FRISCH M, THIEMANN A, FU J, SCHRAG TA, SCHOLTEN S, MELCHINGER AE, 2010: Transcriptome-based distance measures for grouping of germplasm and prediction of hybrid performance in maize. *Theor Appl Genet* 120: 415-427.
- GEIGER HH, MIEDANER T, 2009: Rye breeding. In: Carena MJ (Ed.), *Cereals*, pp. 157-181. *Handbook of Plant Breeding*, Vol. 3. Springer Science + Business Media.
- GEIGER HH, SCHNELL FW, 1970: Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). *Crop Sci* 10: 590-593.
- HACKAUF B, WEHLING P, 2002: Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome. *Plant Breed* 121: 17-25.
- HACKAUF B, WEHLING P, 2005: Approaching the self-incompatibility locus Z in rye (*Secale cereale* L.) via comparative genetics. *Theor Appl Genet* 110: 832-845.
- HACKAUF B, RUDD S, VAN DER VOORT JR, MIEDANER T, WEHLING P, 2009: Comparative mapping of DNA sequences in rye (*Secale cereale* L.) in relation to the rice genome. *Theor Appl Genet* 118: 371-384.
- HACKAUF B, KORZUN V, WORTMANN H, WILDE P, WEHLING P, 2012: Development of COS markers linked to the restorer gene Rfp1 in rye. *Mol Breed*, in press.
- HARDY OJ, 2003: Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterisation of isolation by distance processes using dominant genetic markers. *Mol Ecol* 12: 1577-1588.
- HARDY OJ, VEKEMANS X, 2002: SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2: 618-620.
- HASENEYER G, SCHMUTZER T, SEIDEL M, ZHOU R, MASCHER M, SCHÖN CC, TAUDIEN S, SCHOLZ U, STEIN N, MAYER KFX, BAUER E, 2011: From RNA-seq to large-scale genotyping - genomics resources for rye (*Secale cereale* L.). *BMC Plant Biol* 11: 131. (DOI: 10.1186/1471-2229-11-131).
- INGVARSSON PK, STREET NR, 2011: Association genetics of complex traits in plants. *New Phytol* 189: 909-922.
- LI Y, HASENEYER G, SCHÖN CC, ANKERST DP, KORZUN V, WILDE P, BAUER E, 2011a: High levels of nucleotide diversity and fast decline of linkage disequilibrium in rye (*Secale cereale* L.) genes involved in frost response. *BMC Plant Biol* 11: 6. (DOI: 10.1186/1471-2229-11-6).
- LI Y, BÖCK A, HASENEYER G, KORZUN V, WILDE P, SCHÖN CC, ANKERST DP, BAUER E, 2011b: Association analysis of frost tolerance in rye using candidate genes and phenotypic data from controlled, semi-controlled, and field phenotyping platforms *BMC Plant Biol* 11: 146. (DOI:10.1186/1471-2229-11-146).
- LIN YR, SCHERTZ KF, PATERSON AH, 1995: Comparative analysis of QTLs affecting plant height and maturity across the poaceae, in reference to an interspecific sorghum population. *Genetics* 141: 391-411.
- MAENHOUT S, DE BAETS B, HAESAERT G, 2009: Prediction of maize single-cross hybrid performance: support vector machine regression versus best linear prediction. *Theor Appl Genet* 120: 415-427.
- MAGO R, MIAH H, LAWRENCE GJ, WELLINGS CR, SPIELMEYER W, BARIANA HS, MCINTOSH RA, PRYOR AJ, ELLIS JG, 2005: High-resolution mapping and mutation analysis separate the rust resistance genes Sr31, Lr26 and Yr9 on the short arm of rye chromosome 1. *Theor Appl Genet* 112: 41-50.
- MASOJĆ P, MILCZARSKI P, 2005: Mapping QTLs for alpha-amylase activity in rye grain. *J Appl Genet* 46: 115-123.
- MATTHIES IE, VAN HINTUM T, WEISE S, RÖDER MS, 2012: Population structure revealed by different marker types (SSR or DArT) has an impact on the results of genome-wide association mapping in European barley cultivars. *Mol Breed*, in press (DOI: 10.1007/s11032-011-9678-3).
- MIEDANER T, HÜBNER M, 2011: Qualitätsansprüche für unterschiedliche Verwendungszwecke bei Hybridroggen. Bericht 61. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2010, pp. 45-49. LFZ Raumberg-Gumpenstein, Irdning.
- MÜCKE M, MEYERCORDT A, 2009: Bundesweite Zusammenstellung der Landessortenversuche Winterroggen und Wintertriticale im Ökologischen Landbau 2008. Landwirtschaftskammer Niedersachsen. Pflanzenbauliche Versuchsbericht-Datenbank, Informationssystem Integrierte Pflanzenproduktion e.V., Bad Kreuznach [Internet: [http://www.isip.de/coremedia/generator/isip/Versuchsberichte/Versuchsberichte,templateId=renderPrintView.html?hortigategeweg=\\_swh\\_2/wo/uDhrIZrOTgAtGgqa1QNhz0/6.3.6.3.23.7.1.1.11.1](http://www.isip.de/coremedia/generator/isip/Versuchsberichte/Versuchsberichte,templateId=renderPrintView.html?hortigategeweg=_swh_2/wo/uDhrIZrOTgAtGgqa1QNhz0/6.3.6.3.23.7.1.1.11.1); verifiziert 28 Jan 2012].
- NEUMANN K, KOBILJSKI B, DENCIC, VARSHNEY RK, BÖRNER A, 2011: Genome-wide association mapping: a case study in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Breed* 27: 37-58.
- PATERSON AH, LIN YR, LI Z, SCHERTZ KF, DOEBLEY JF, PINSON SR, LIU SC, STANSEL JW, IRVINE JE, 1995: Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci. *Science* 269: 1714-1718.
- PERRIER X, JACQUEMOUD-COLLET JP, 2009: DARwin5, Dissimilarity Analysis and Representation for Windows. CIRAD, Agricultural Research for Development. [Internet: <http://darwin.cirad.fr/darwin/>; verifiziert 28 Jan 2012].
- PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY PJ, 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Internet: <http://www.R-project.org/>].
- TOLLENAAR M, LEE EA, 2006: Dissection of physiological processes underlying grain yield in maize by examining genetic improvement and heterosis. *Maydica* 51: 399-408.
- RAMAN H, STODART B, RYAN PR, DELHAIZE E, EMEBIRI L, RAMAN R, COOMBES N, MILGATE A, 2010: Genome-wide association analyses of common wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm identifies multiple loci for aluminium resistance. *Genome* 53: 957-966.
- SCHRAG TA, MELCHINGER AE, SORENSEN AP, FRISCH M, 2006: Prediction of single-cross hybrid performance for grain yield and grain dry matter content in maize using AFLP markers associated with QTL. *Theor Appl Genet* 113: 1037-1047.
- SPIERTZ JHJ, 2010: Nitrogen, sustainable agriculture and food security. A review. *Agron Sustain Dev* 30: 43-55.
- TINKER NA, KILIAN A, WIGHT CP, HELLER-USZYNSKAK, WENZL P, RINES HW, BJØRNSTAD A, HOWARTH CJ, JANNINK JL, ANDERSON JM, ROSSNAGEL BG, STUTHMAN DD, SORRELLS ME, JACKSON EW, TUVESON S, KOLB FL, OLSSON O, FEDERIZZI LC, CARSON ML, OHM HW, MOLNAR SJ, SCOLES

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

---

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



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

Christian Obermeier<sup>1\*</sup>, Muhammed Ali Hossain<sup>1</sup>, Rod Snowdon<sup>1</sup>,  
Jessica Knüfer<sup>2</sup>, Andreas von Tiedemann<sup>2</sup> and Wolfgang Friedt<sup>1</sup>

## Abstract

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

## Keywords

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

## Summary

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Acknowledgements

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

## References

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

# Development of molecular markers using high-throughput sequencing technology

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

## Abstract

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

## Keywords

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

## Introduction

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

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

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

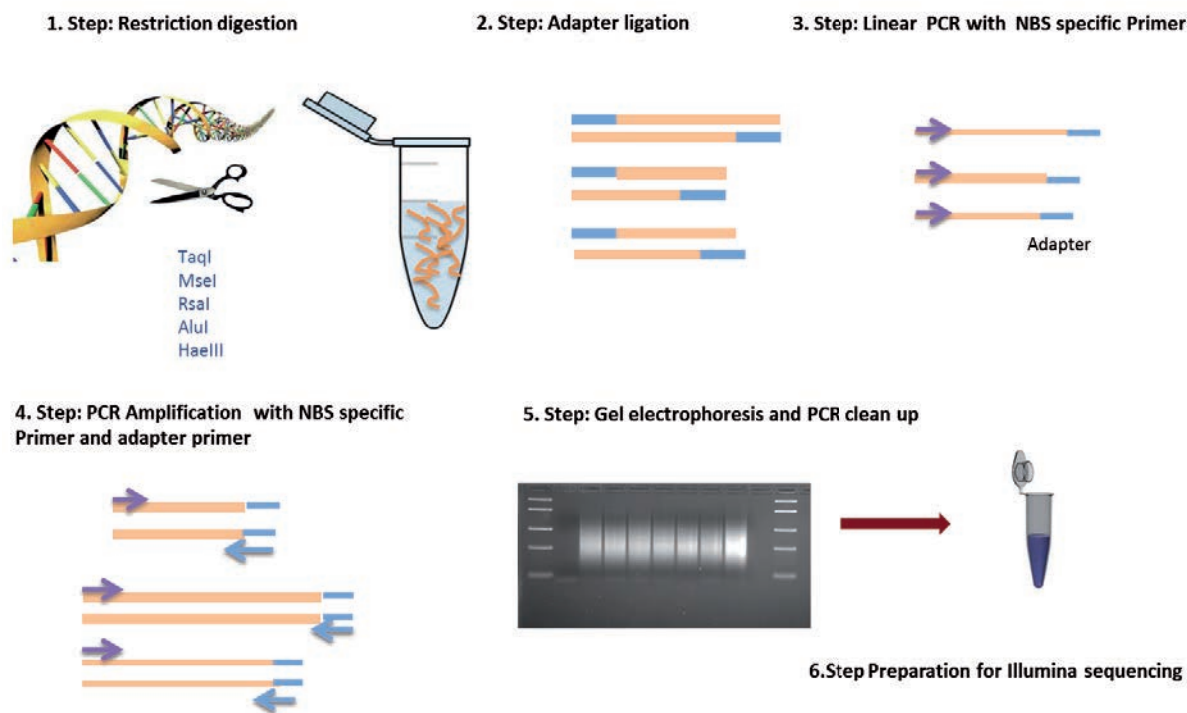
Recent research has demonstrated that *R* alleles can be stacked within one genotype, thereby increasing the level of resistance (DARSOW et al. 1987, WERNER et al. 2005, KIM et al. 2012) and extending the life time of individual effective *R* alleles. The largest effect on strength and durability of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

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

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

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

## Isolation of NBS Fragments



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

### Material and Methods

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

### Results

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

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

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

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

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

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

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

## Acknowledgment

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

## References

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

---

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



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

Wolfgang Schweiger<sup>1\*</sup>, Barbara Steiner<sup>1</sup>, David P. Kreil<sup>2</sup>, Franz Berthiller<sup>3</sup>,  
Marc Lemmens<sup>1</sup>, Gary J. Muehlbauer<sup>4</sup> and Hermann Buerstmayr<sup>1</sup>

### Abstract

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

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

### Keywords

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

## Acknowledgments

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

## References

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

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

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

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

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

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





# Entwicklung eines auf Mikrosatelliten basierenden Nachweissystems zur Differenzierung von Gerstensorten

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

Jun Wang<sup>1,2</sup>, Verena Peterseil<sup>1\*</sup>, Helmut K. Mayer<sup>2</sup> und Rupert Hohegger<sup>1</sup>

### Abstract

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

### Keywords

Differentiation of varieties, *Hordeum vulgare*, microsatellites

### Einleitung

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

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

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

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

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

### Material und Methoden

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

<sup>1</sup> Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

<sup>2</sup> Universität für Bodenkultur, Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, Muthgasse 11, A-1190 WIEN

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

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

### Extraktion der DNA

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

### Amplifizierung der Mikrosatelliten mittels PCR

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

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

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

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

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

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

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

(iv) Verteilung der Mikrosatelliten im Genom

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

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

### Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

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

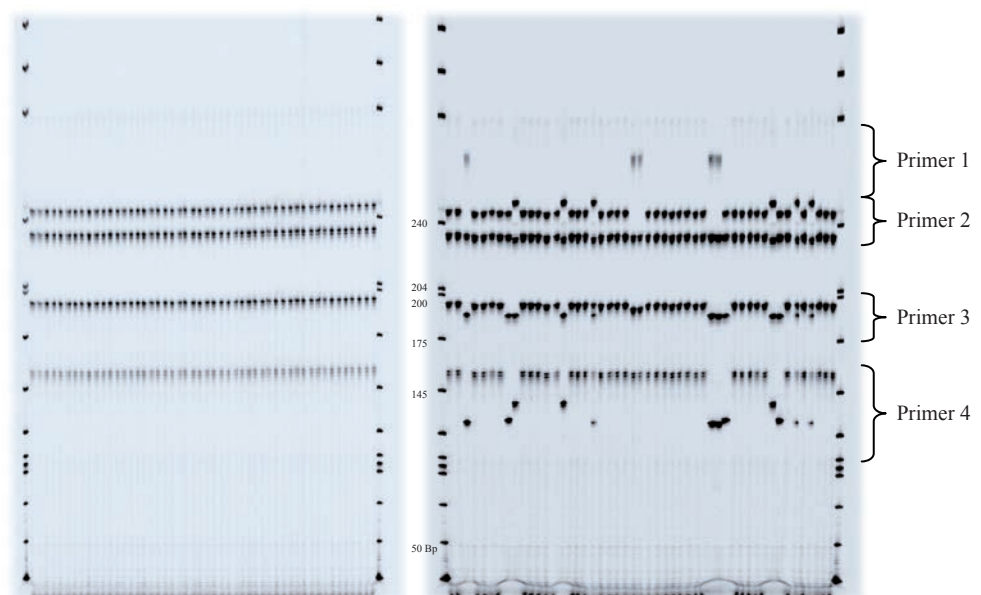


Abbildung 1: Elektrophorese von Körnern der Sorte Breunskylyie (links) sowie von einer 50 Korn Probe (rechts)

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

## Ergebnisse

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

## Zusammenfassung

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

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

## Literatur

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

Andreas Firzinger<sup>1\*</sup>

## Abstract

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

## Keywords

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

## Einleitung

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

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

## Material und Methoden

### *Probenvorbereitung und -beschaffung*

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

<sup>1</sup> Romer Labs Diagnostic GmbH, Technopark 1, A-3430 TULLN

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

## Methoden

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

## Mais

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

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

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

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

## Sojabohne

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

## Kartoffel

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

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

### Tomate

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

### Zichorie

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

### Weizen und Zuckerrübe

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

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

### Ausblick

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

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

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

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

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

<sup>2</sup> nur tatsächliche transgene Linien berücksichtigt (keine Mutationslinien)

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

## Literatur

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



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

Henrik Schumann<sup>1\*</sup>, Anne Reinders<sup>1</sup>, Alexandra Bothe<sup>1</sup>, Melanie Herker<sup>1</sup>, Stefan Paulus<sup>2</sup> und Jens Léon<sup>1</sup>

### Abstract

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

### Keywords

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

### Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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

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

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

\* Ansprechpartner: Henrik SCHUMANN, [h.schumann@uni-bonn.de](mailto:h.schumann@uni-bonn.de)

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

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

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

und das Potential auch dieser nicht-invasiven Messmethode aufzuzeigen.

## Danksagung

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

## Literatur

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

# Phänotypisierung mittels Nahinfrarot-Spektroskopie am Beispiel Gelbpigmentgehalt des Weizens

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

Susanne Kirchmaier<sup>1</sup>, Johann Vollmann<sup>1</sup>, Negash Geleta Ayana<sup>1</sup>,  
Susanne Siebenhandl-Ehn<sup>2</sup>, Michael Prückler<sup>2</sup> und Heinrich Grausgruber<sup>1\*</sup>

### Abstract

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

### Keywords

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

### Einleitung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Material und Methoden

### Pflanzenmaterial

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

### Chemische Analyse

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

### NIRS Analyse

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

### Gespikte Proben

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

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

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

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

<sup>1</sup> GP: Gelbpigmentgehalt (ppm  $\beta$ -Carotin Äquivalente 100g<sup>-1</sup> TS)

### Datenanalyse

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

## Ergebnisse und Diskussion

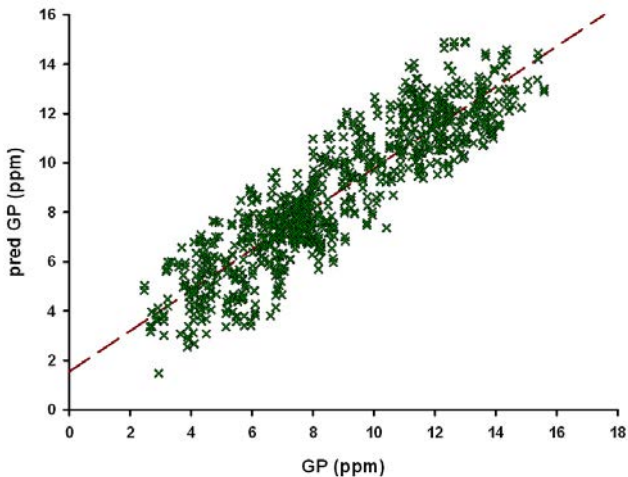
### Gelbpigmentgehalt

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

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

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

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



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

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

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

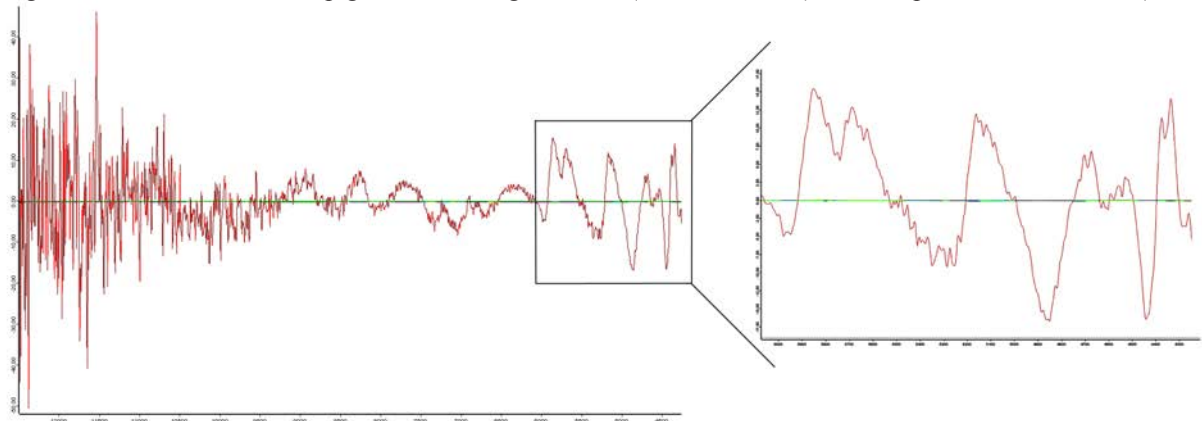
auch Sorten bekannt, die Gehalte im Bereich von Durum aufweisen und die v.a. im asiatischen Raum für die Herstellung von Teigwaren verwendet werden (KRUGER et al. 1992, GRAUSGRUBER et al. 2006). Auch in Europa wurden solche Sorten gezüchtet (SVENSSON 1982, SCHIPPER et al. 1998), erlangten jedoch bis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

### Quantitative Analyse

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

### Qualitative Analyse

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



**Abbildung 2: Regressionskoeffizienten der FT-NIRS Kalibration auf Gelbpigmentgehalt (Angabe der Wellenlänge als Wellenzahl· $\text{cm}^{-1}$ )**

**Figure 2: Regression coefficients for the FT-NIRS prediction model for yellow pigment concentration of wheat flour (wavelength is indicated as wave number· $\text{cm}^{-1}$ )**

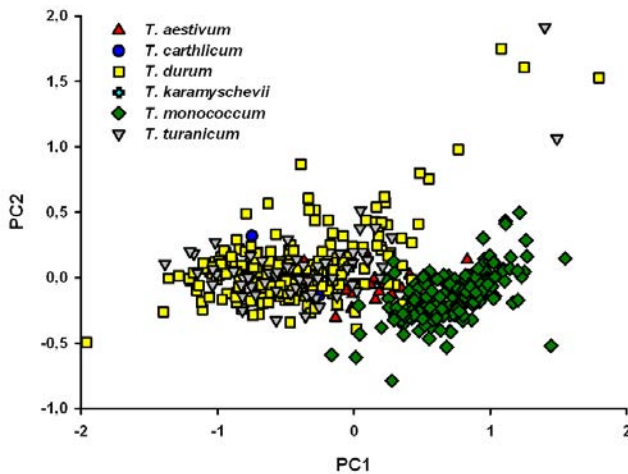


Abbildung 3: Biplot der Hauptkomponentenanalyse der FT-NIRS Spektren ( $\nu=3600-6500 \text{ cm}^{-1}$ )

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

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

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

### Gespikte Proben

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

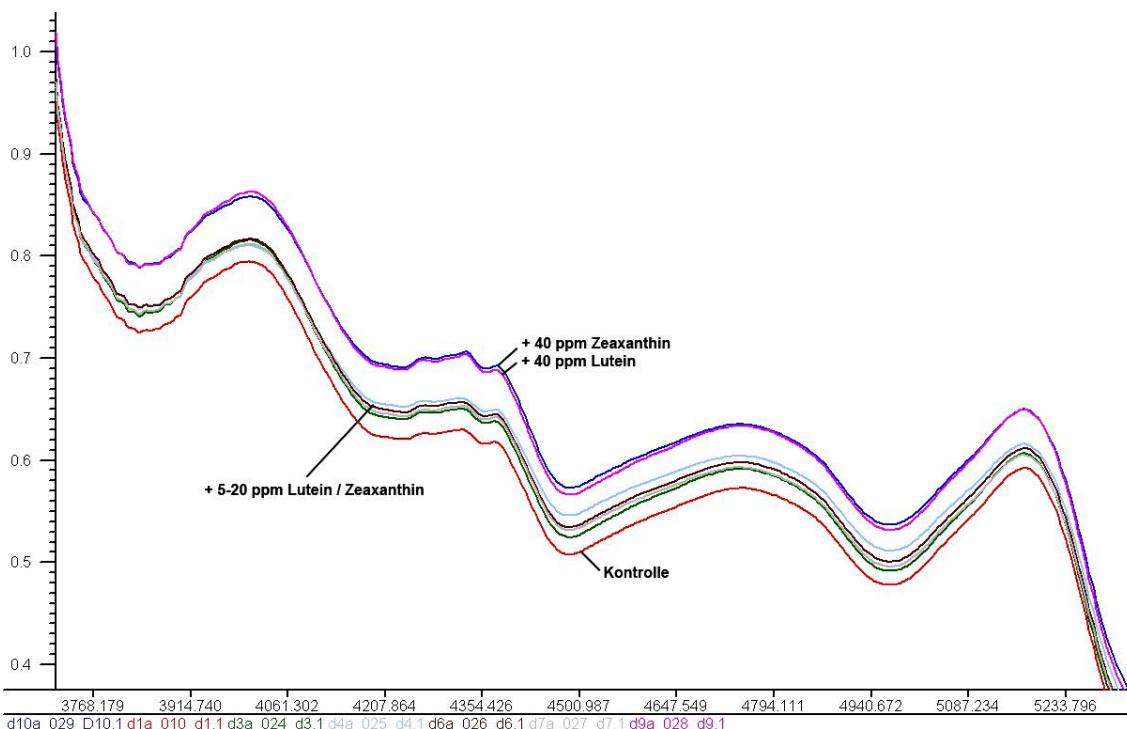


Abbildung 4: FT-NIRS Spektren von Vollkornmehl von Durobonus angereichert mit unterschiedlichen Carotinoiden und Konzentrationen (siehe Tabelle 1; Anreicherungen mit  $\beta$ -Carotin nicht dargestellt)

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

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

## Danksagung

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

## Literatur

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

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





# Greenhouse test for drought tolerance of the CORNET wheat variety set

János Pauk<sup>1\*</sup>, Csaba Lantos<sup>1</sup>, Róbert Mihály<sup>1</sup>, Clemens Flamm<sup>2</sup>, Maren Livaja<sup>3</sup>,  
László Cseuz<sup>1</sup>, Michael Schmolke<sup>3</sup> and Szabolcs Ruthner<sup>4</sup>

## Abstract

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

## Keywords

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

## Introduction

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

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

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

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

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

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

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

<sup>2</sup> Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

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

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

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

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

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

## Material and methods

### Plant material

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

### Experimental condition

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

### Trait evaluation

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

### Statistical analysis

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

## Results and discussion

### Heading time

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

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

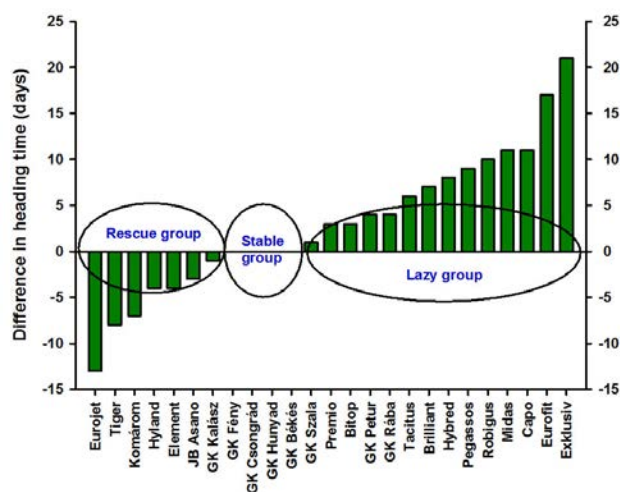


Figure 1: Effect of two different water treatments on heading time of winter wheat: differences of the drought stress treatment compared to the well watered (control) treatment

### Plant height

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

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

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

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

### Dry matter yield of straw

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

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

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

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

### Spike length

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

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

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

### Number of spikelets

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

### Seed number per main spike

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

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

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

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

### Grain yield

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

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

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

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

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

## Acknowledgements

This project was supported by CORNET (Collective Research NETWORKing) and financed in Austria by FFG and Saatgut Österreich, and in Germany by AiF, BMWi and the German Federation of Private Plant Breeders. The Hungarian authors would like to thank for the financial support of the CORNET\_6\_08\_WHEATSTR project by the NKTH (National Office for Research and Technology; egr. numb.: OM-00887/2009) and to express their gratitude to E. Búza, S. Vajajdi-Nagy, S. Palaticki, and F. Markó for their conscientious work.

## References

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

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

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

---

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

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

Clemens Flamm<sup>1\*</sup>, Caroline Engel<sup>1</sup>, Elisabeth Zechner<sup>2</sup>,  
Maren Livaja<sup>3</sup>, Michael Schmolke<sup>3</sup> and János Pauk<sup>4</sup>

### Abstract

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

### Keywords

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

### Introduction

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

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

### Materials and Methods

In 2010 and 2011 25 winter wheat varieties were cultivated at two Austrian locations, i.e. Breitstetten and Tattendorf, in the Pannonic region and at one Hungarian site, i.e. Szeged. At each location the varieties were cultivated in the natural precipitation surrounding and, additionally, in an irrigated form. The irrigation treatments were the following: 40-58 mm supplementary water divided into two parts in Austria and 10 mm in Hungary in 2010, and 80-90 mm in Austria and 44 mm in Hungary divided into three and four parts, respectively, in 2011. The selected varieties represented a wide range of baking quality. Each of the participating countries, i.e. Austria, Germany and Hungary, proposed eight genotypes. Capo was selected as supplementary check variety. The field experiments were arranged as lattice designs with three to four replications. Plot size varied from 6.5 m<sup>2</sup> (Hungary) to 12.5-13.5 m<sup>2</sup> (Austria). In Austria nitrogen fertilization ranged in total from 93 to 140 kg N ha<sup>-1</sup> divided into three doses on each location, in Hungary 100 kg N ha<sup>-1</sup> divided into two doses were applied.

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

### Results

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

<sup>1</sup> Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

<sup>2</sup> Saatucht Edelhof, Edelhof 1, A-3910 ZWETTL

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

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

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

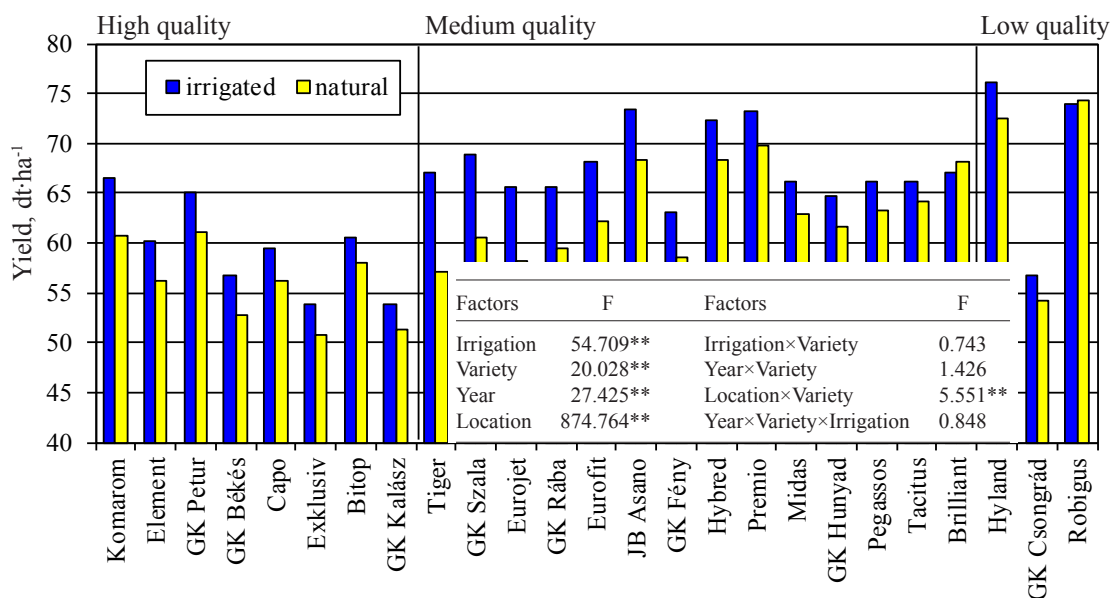


Figure 1: Reaction in grain yield of 25 winter wheat varieties to different water supply (means of 2 locations 2010 and 3 locations 2011; ordered by decreasing differences between rainfed and irrigated trials)

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

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

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

Most varieties reacted to water deficit by decreasing the primary and secondary yield components. Only a few genotypes reacted by increasing some components. GK Kalász, Komarom, Robigus, Element, GK Hunyad and Tacitus had more ears per m<sup>2</sup> in the trials with less available water. Capo

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

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



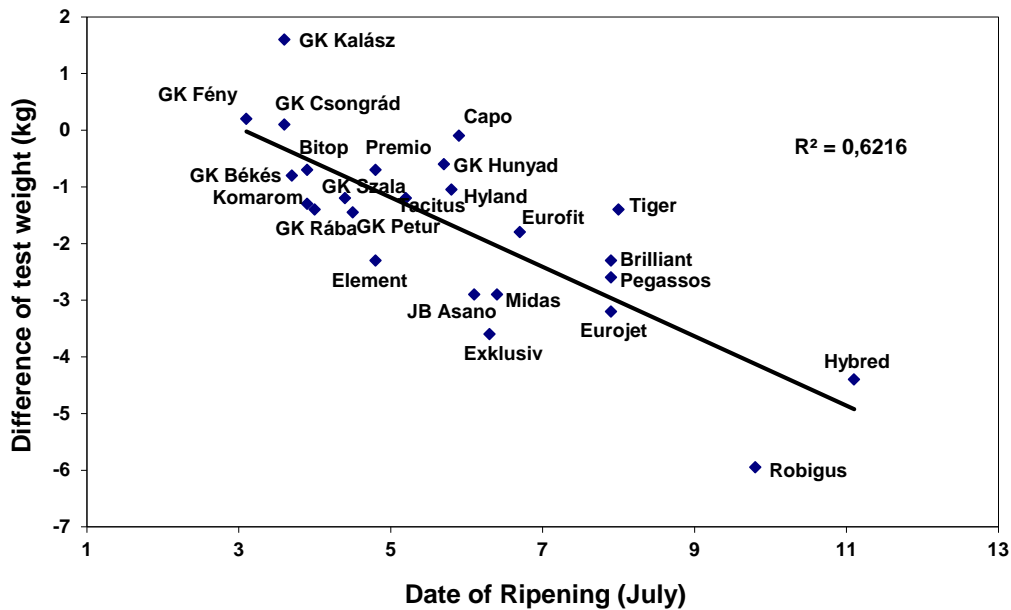


Figure 2: Correlation of the reaction of test weight to reduced water supply (Tattendorf 2010) and the date of ripening (means of 10 trials 2010-2011) of 25 wheat varieties

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

size in both trials. The number of kernels per square meter decreased with most of the varieties except Exklusiv (+126). Hybred with 2523, Tiger with 2193 and GK Skála with 2011 grains per square meter less showed the greatest differences in grains m<sup>-2</sup> between irrigated and rainfed trials. Robigus, Tacitus and Komarom had from 0.5 g to 0.6 g lighter ears in the rainfed sites than in the irrigated ones. A few varieties achieved a slightly higher ear weight under drought stress (Capo, GK Csongrád, Brilliant). For test weight no effects of different water supply were found when analysing the mean of all Austrian and Hungarian trials. However, test weight mostly reacts to drought stress just before the harvest. To better demonstrate these

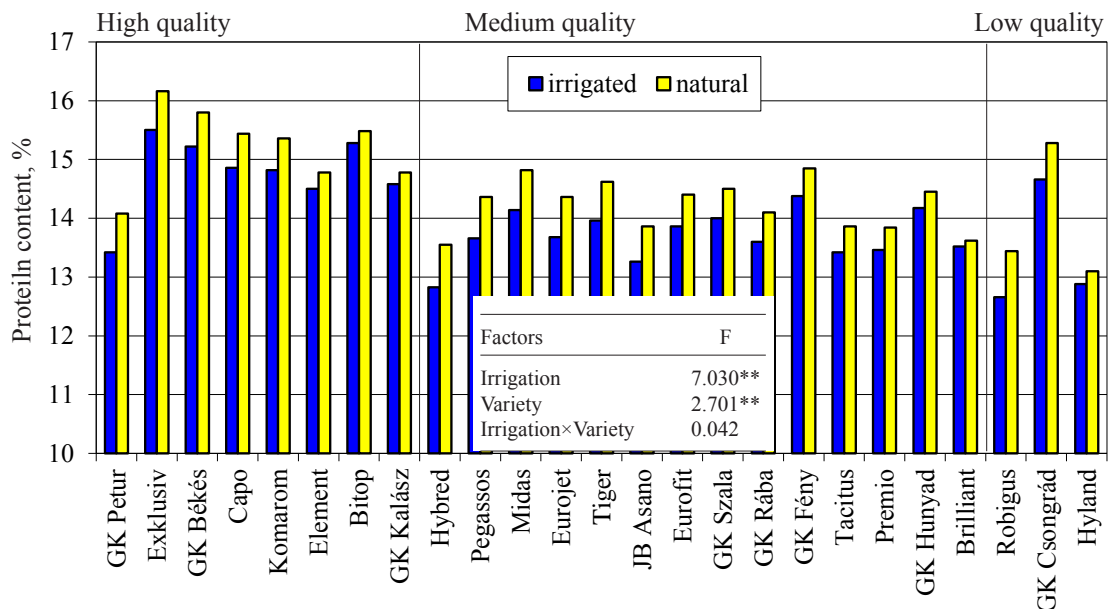


Figure 3: Reaction in protein content of 25 winter wheat varieties to different water supply (means of 2 locations 2010 and 3 locations 2011; ordered by decreasing differences between rainfed and irrigated trials)

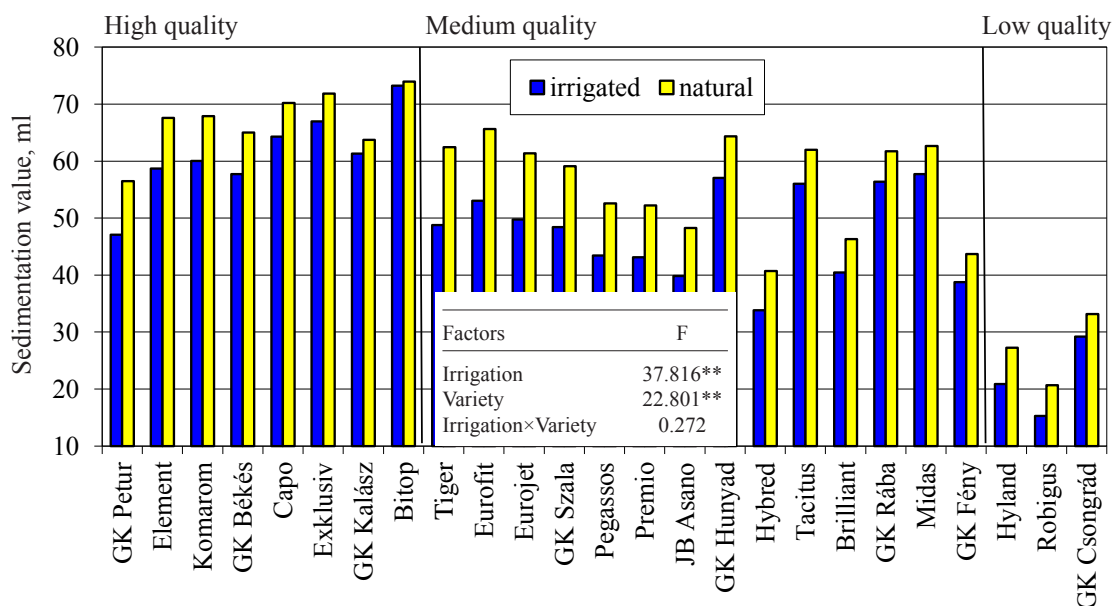


Figure 4: Reaction in sedimentation value of 25 winter wheat varieties to different water supply (means of 1 location 2010 and 2 locations 2011; ordered by decreasing differences between rainfed and irrigated trials)

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

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

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

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

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

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

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

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

## Discussion

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

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

## Acknowledgements

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

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

## References

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

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



# Characterization of a segregating winter wheat population regarding abiotic stress

Maren Livaja<sup>1\*</sup>, Clemens Flamm<sup>2</sup>, János Pauk<sup>3</sup> and Michael Schmolke<sup>1</sup>

## Abstract

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

## Keywords

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

## Introduction

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

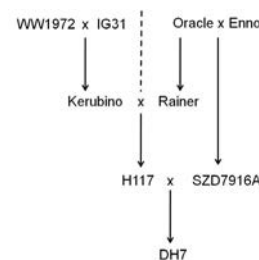
Markers associated with tolerance for a variety of environmental stresses rank as important targets for marker-assisted selection (MAS). Efforts to identify quantitative trait loci (QTL) associated with drought using molecular mapping approaches represent an important first step to achieve this goal.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

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

## Material and Methods

### Plant material

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



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

### Greenhouse experimental design

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

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

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

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

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

## Phenotyping

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

## Marker analysis and map development

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

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

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

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

## Statistical and QTL analysis

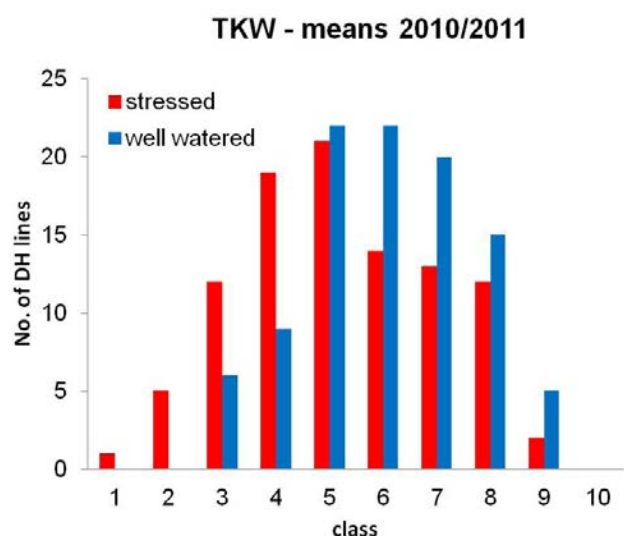
First, the dataset of each treatment was statistically analyzed separately to determine the significance of differences between genotypes. Estimation of correlation coefficients and analysis of variation was performed using Plabstat (University Hohenheim, Stuttgart, Germany), to identify significant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

## Results

### Phenotypic and correlation analysis

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

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



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

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

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

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

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

### Genetic map

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

### QTL analysis

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

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

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

<sup>1</sup> abbreviations see Table 1

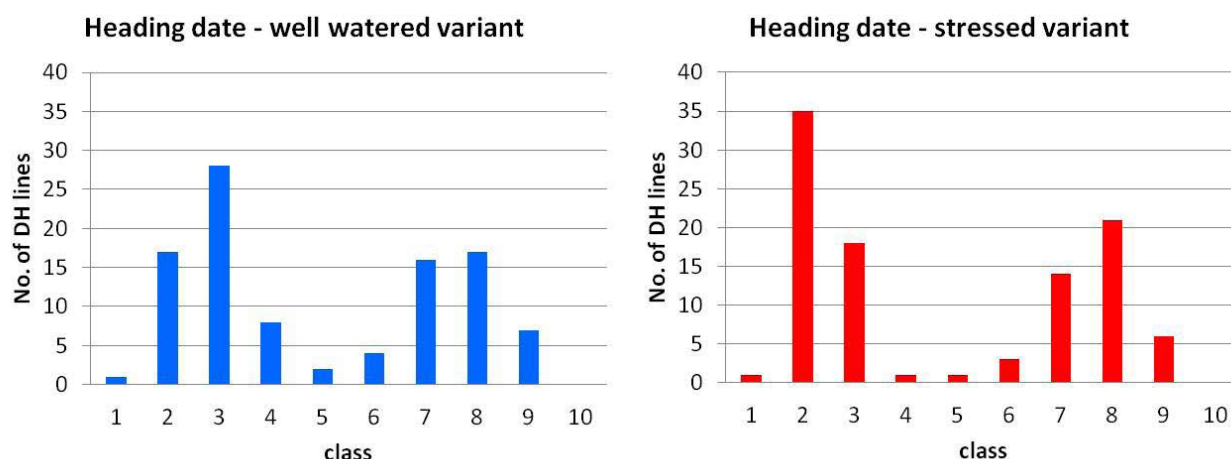


Figure 3: Frequency distribution of the heading date for both treatment variants

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

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

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

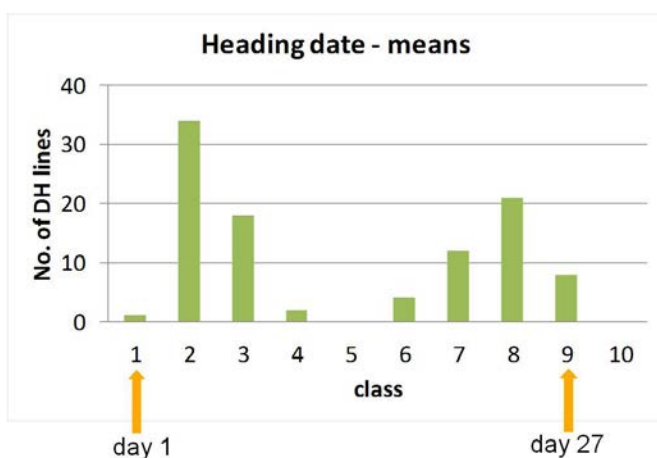


Figure 4: Frequency distribution of the mean heading date from both treatment variants

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

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

## Conclusions

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



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

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

<sup>1</sup> Abbreviations see Table 1

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

## Acknowledgement

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

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

## References

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

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



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

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

Michael Oberforster<sup>1\*</sup>, Andreas Ratzenböck<sup>1</sup>, Manfred Werteker<sup>1</sup>,  
Anton Neumayer<sup>2</sup>, Elisabeth Zechner<sup>3</sup> und Lorenz Hartl<sup>4</sup>

#### Abstract

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

#### Keywords

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

#### Einleitung

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

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

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

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

#### Material und Methoden

##### *Pflanzenmaterial und Umwelten*

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

<sup>1</sup> Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

<sup>2</sup> Saatucht Donau GesmbH & CoKG, A-4981 REICHERSBERG 86

<sup>3</sup> Saatucht Edelfhof, Edelfhof 1, A-3910 ZWETTL

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

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

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

### *Keimungsindex (Dormanz)*

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

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

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

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

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

### *Auswuchs in der Feuchtkammer*

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

### *Auswuchs am Feld*

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

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

### *Fallzahl*

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

### *Statistische Auswertung*

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

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

## Ergebnisse und Diskussion

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

### Keimungsindex (Dormanz)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Auswuchs in der Feuchtkammer

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

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

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

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

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

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

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

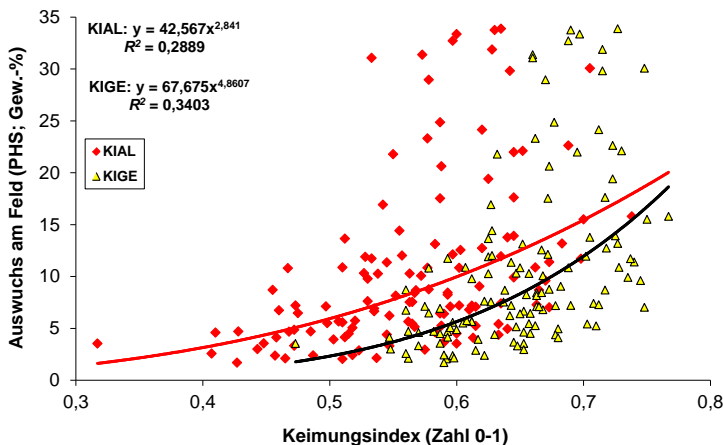
<sup>1</sup> KIAL, Keimungsindex (bezogen auf alle Körner); AUFK, Auswuchs in der Feuchtkammer (1-9); Zw10, Zwetl 2010; Re10, Reichersberg 2010; Re11a, Reichersberg 2011-1. Erntetermin; Re11b, Reichersberg 2011-2. Erntetermin; Fu11a, Fuchsenbigl 2011-1. Wh.-1. Erntetermin; Fu11b, Fuchsenbigl 2011-2.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

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

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

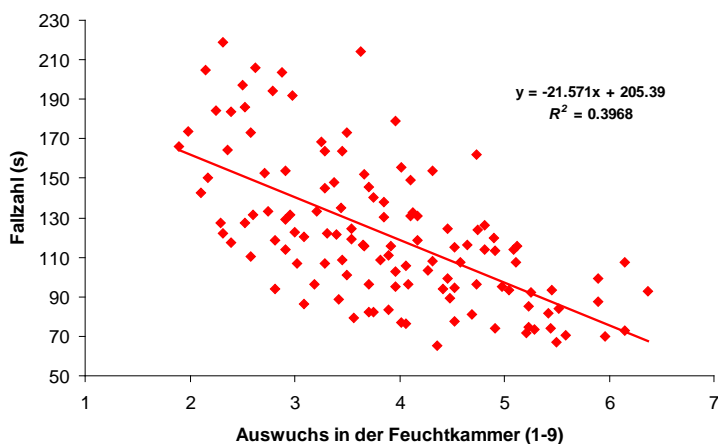
Merkmal <sup>1</sup>	KIGE	KF	AUFK	PHS	Fallzahl
KIAL	0,95**	0,87**	0,78**	0,44**	-0,56**
KIGE	-	0,69**	0,79**	0,51**	-0,60**
KF	-	-	0,59**	0,28**	-0,41**
AUFK	-	-	-	0,56**	-0,63**
PHS	-	-	-	-	-0,75**

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



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

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



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

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

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

### Auswuchs am Feld

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

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

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

Bei der Probenahme für das Merkmal Prozentu-



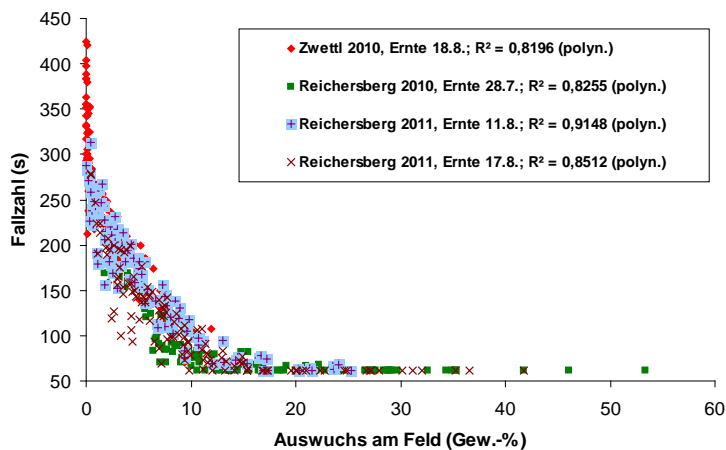


Abbildung 3: Intervarieter Zusammenhang von Auswuchs und Fallzahl bei natürlichen Niederschlagsbedingungen (124 Winterweizen, 4 Umwelten, 2010-2011)

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

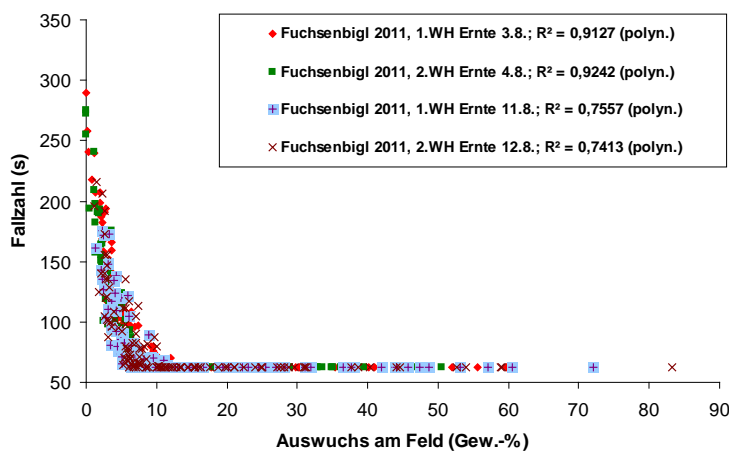


Abbildung 4: Intervarieter Zusammenhang von Auswuchs und Fallzahl nach Beregnung am Standort Fuchsenbigl 2011 (124 Winterweizen, 2 Erntetermine, 2 Wiederholungen)

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

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

## Fallzahl

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

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

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

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

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

## Zusammenfassung

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

## Danksagung

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

## Literatur

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

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

Volker Mohler<sup>1\*</sup>, Günther Schweizer<sup>1</sup> und Lorenz Hartl<sup>1</sup>

## Abstract

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

## Keywords

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

## Einleitung

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

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

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

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

## Material und Methoden

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

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

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

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

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

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