

# Selektion von Introgressionslinien in Sommergerste mit dem Ziel der Verifikation von QTLs für Malzqualität

I. SCHMALENBACH und K. PILLEN

## Einleitung

Eine Möglichkeit das genetische Potential von Wildarten für die Züchtung nutzbar zu machen ist die Entwicklung von Introgressionslinien (ILs). Nach ZAMIR (2001) repräsentiert ein komplettes Set von ILs die Gesamtheit eines exotischen Wildelter-Genoms im genomischen Hintergrund einer Kulturform mit Hilfe von überlappenden Donorsegmenten. Wie in *Abbildung 1* dargestellt, enthält jede Introgressionslinie nur noch ein einzelnes, markerdefiniertes Chromosomensegment der Wildform (schwarze Segmente) vor dem ansonsten einheitlichen genetischen Hintergrund der Kulturform (weiße Segmente). Die ILs werden durch mehrmalige Rückkreuzung mit dem Kulturelter und anschließende Selbstungen entwickelt. Parallel wird eine markergestützte Selektion (MAS) durchgeführt. ESHED und ZAMIR (1994) entwickelten mit Hilfe von 375 RFLP-Markern ein Set von 50 Introgressionslinien für die Wildart *Lycopersicon pennellii* in der Kulturart *L. esculentum*. Da jede IL nur noch einen geringen Anteil der Wildgene trägt, wurden die Fertilitätsprobleme, die ansonsten bei der Tomate in hohem Maße auftreten, stark reduziert.

Daher war es möglich Ertragsmerkmale, wie z.B. den Fruchtertrag pro Pflanze, zu erfassen. Weitere Vorteile von ILs sind ein reduzierter 'linkage drag', da es sich bei den QTL-tragenden Segmenten um kleine Regionen handelt und somit weniger epistatische Wechselwirkungen zwischen nicht gekoppelten Wildgenen auftreten. Dadurch können auch kleinere phänotypische Effekte, die z.B. bei den Kreuzungseltern nicht detektiert werden können, statistisch erfasst werden. Auch erleichtern ILs die Feinkartierung von QTLs und ermöglichen die Untersuchung der phänotypischen Effekte von QTL-Interaktionen durch Kreuzung QTL-tragender ILs. Bisher wurden

komplette Sets von Introgressionslinien für Tomate (ESHED und ZAMIR 1994) und Weizen (PESTSOVA et al. 2001 und 2006) entwickelt. Für die Kulturarten Reis und Salat wurden BILs ('backcross inbred lines') erstellt (LIN et al. 1998, JEUKEN und LINDHOUT 2004). Diese weisen eine ähnliche genetische Struktur auf wie ILs, enthalten aber unter Umständen mehr als eine Introgression pro Linie.

Im Rahmen des GABI (Genomanalyse im Biologischen System Pflanze)-Projektes GABI-Malt soll erstmals ein komplettes Set an Wildgerste-Introgressionslinien erstellt werden. Dieses soll in Zukunft für die Erforschung von Genen mit Einfluss auf die Komplexe Malzqualität, agronomische Leistung, abiotische Stresstoleranz und Krankheitsresistenzen eingesetzt werden. Darüber hinaus können die Gerste-ILs Anwendung in der Züchtung neuer Sorten finden.

## Strategie zur Entwicklung und Analyse von Introgressionslinien in Sommergerste

Ausgangspunkt des hier beschriebenen Projektes sind 40 pre-ILs (Kandidaten für Introgressionslinien) der Sommergerstenpopulation S42, die im Rahmen des Projektes GABI-Diversity aus 301 BC<sub>2</sub>DH-Linien selektiert wurden (VON KORFF et al. 2004). Die DH-Linien wurden aus einer Kreuzung zwischen der Braugerstensorte Scarlett (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) und der israelischen Wildgerstenakzession ISR 42-8 (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*) entwickelt.

Die pre-ILs wurden anhand verschiedener Kriterien für die Entwicklung von Introgressionslinien ausgewählt. Zum einen sollten sie einen geringen Anteil des Wildelter-Genoms und neben der Zielintrogression nur eine geringe Anzahl zusätzlicher Donor-Segmente aufweisen. Ein weiteres Selektionskriterium

war die Überlappung der Zielintrogressionen, denn nur so kann gewährleistet werden, dass später das gesamte Wildelter-Genom repräsentiert wird. Hierzu ist es notwendig, dass die Zielintrogression mindestens zwei Markerloci umfasst.

Im GABI-Malt-Projekt wurden die pre-ILs einmal mit Scarlett zurückgekreuzt (BC<sub>3</sub>), um den Anteil des Wildeltergenoms weiter zu verringern und die Zielregion zu verkleinern. Anschließend wurden sie bisher viermal geselbstet (BC<sub>3</sub>S<sub>4</sub>), um vollständige Homozygotie zu erreichen und parallel in der BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> mit Hilfe von 98 SSR-Markern (VON KORFF et al. 2004) genotypisiert (siehe *Abbildung 2*). Hierbei wurden alle Markerloci untersucht, die bei den pre-ILs den Wildgenotyp aufwiesen oder für die keine Genotypinformation vorlag. Im Durchschnitt wurden 137 Pflanzen mit durchschnittlich 12 informativen SSRs pro pre-IL untersucht.

Anhand dieser Genotypdaten wurden anschließend brauchbare Pflanzen als Introgressionslinien selektiert, wobei zwischen fertigen und potentiellen ILs unterschieden wurde. Als fertige ILs werden solche Linien bezeichnet, die nur noch die Zielintrogression in homozygoter Form aufweisen und an allen anderen Markerloci reinerbig das Kulturallel tragen. Dahingegen sind die potentiellen ILs dadurch gekennzeichnet, dass noch ein oder mehrere Loci Heterozygotie zeigen. Diese ILs müssen im Gegensatz zu den fertigen ILs über zusätzliche Selbstungen und damit auftretende genetische Rekombinationen bis zur kompletten Homozygotie weiterentwickelt werden.

Die fertigen ILs wurden in der BC<sub>3</sub>S<sub>4</sub> anhand der Untersuchung einzelner SSR-Loci verifiziert. Bei den potentiellen ILs werden zurzeit alle noch heterozygot besetzten Loci erneut in nachfolgenden

**Autoren:** Dipl. Ing. agr. Inga SCHMALENBACH und PD Dr. Klaus PILLEN, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, AG Barley Genetics, Carl-von-Linné Weg 10, D-50829 KÖLN, schmal@mpiz-koeln.mpg.de



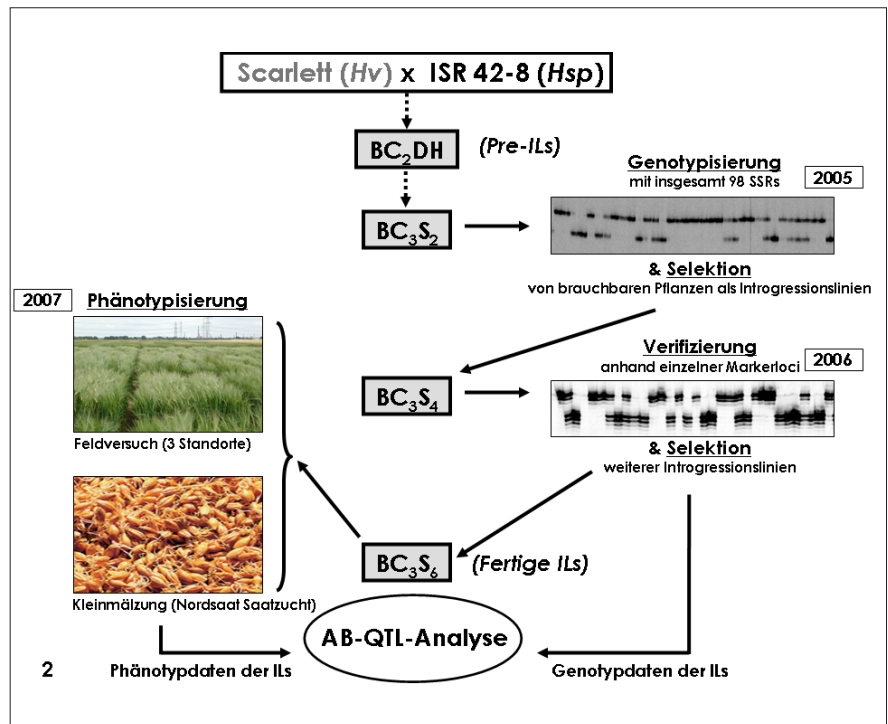
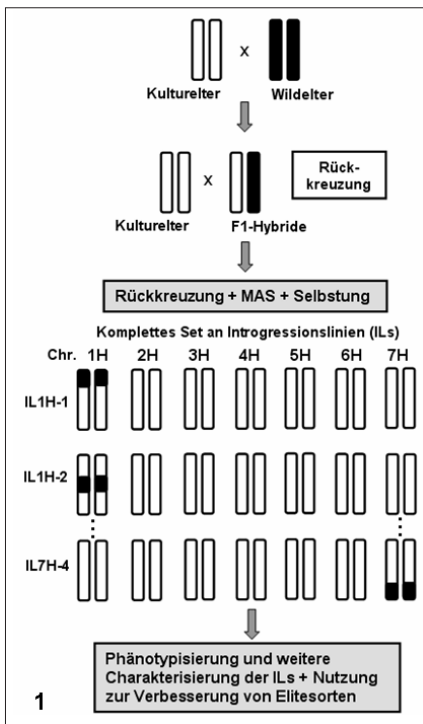


Abbildung 1: Strategie zur Entwicklung und Nutzung eines kompletten Sets von Introgressionslinien (ILs), verändert nach Zamir 2001. Abbildung 2: Projektübersicht zur Entwicklung von ILs aus der Sommergerstpopulation S42.

Selbstungsgenerationen genotypisiert, um neue fertige ILs zu selektieren. Alle bis August 2006 fertig entwickelten Linien werden in dem hier beschriebenen Projekt bis zur BC<sub>3</sub>S<sub>6</sub> vermehrt, um ausreichend Saatgut für den in 2007 stattfindenden dreierartigen Feldversuch an den Standorten Gudow (Nordsaat Saatzucht), Herzogenaurach (Saatzucht Breun) und Wesseling (Universität Bonn) und für die bei der Nordsaat Saatzucht durchgeführte Kleinmälzung zu erhalten.

zucht durchgeführte Kleinmälzung zu erhalten.

### Ergebnisse und Diskussion

Es konnten insgesamt 92 Introgressionslinien selektiert werden. Hiervon sind bisher 55 ILs fertig entwickelt, wogegen die restlichen 37 Linien weiterhin untersucht und geselbstet werden müssen (schwarze bzw. graue Balken in Abbildung 3). Bei allen bisher fertigen Li-

nien umfasst die Introgression durchschnittlich 31,7 cM (Spanne: 7,0 - 100,5 cM), wobei acht Linien eine Introgression mit einer Größe von < 15 cM tragen. Es werden zurzeit mindestens 56,5 % und maximal 92,6 % des Genoms pro Chromosom (5H bzw. 4H) durch fertige ILs abgedeckt. Circa die Hälfte der fertigen Linien (28) trägt eine Wildintrogression, die nur noch zwei SSR-Loci beinhaltet. Bei 16 ILs umfasst sie nur

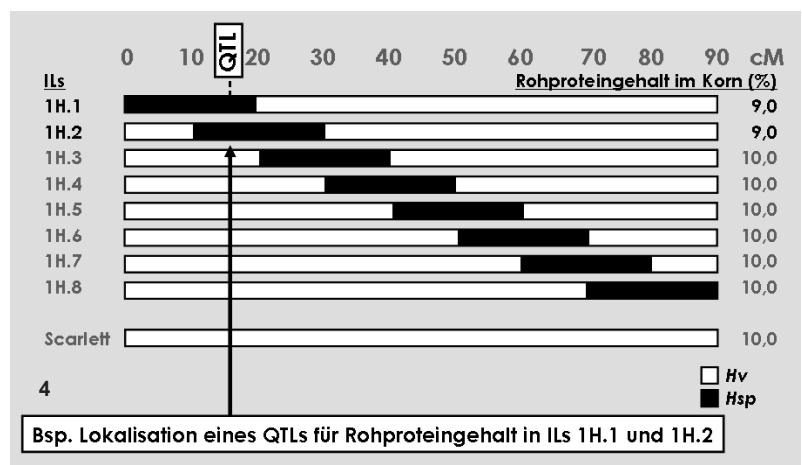
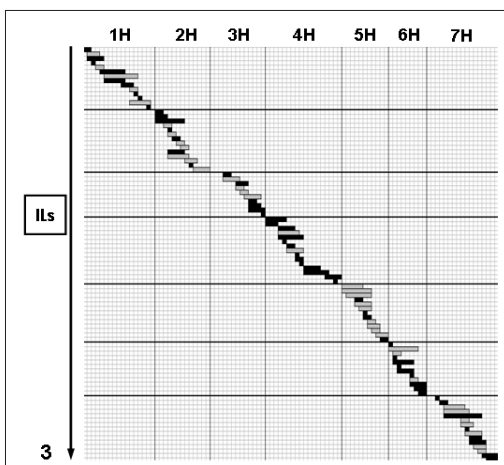


Abbildung 3: Graphische Genotypen von 92 Introgressionslinien aus der Population S42.

Vertikal dargestellt sind die sieben Gerstenchromosomen und horizontal die einzelnen ILs. Die schwarzen Kästchen repräsentieren die jeweilige Wild-Introgression der 55 fertigen ILs, die komplett homozygot sind. Grau dargestellt ist die jeweilige Wild-Introgression der 37 potentiellen ILs. Letztere müssen über Selbstung weiterentwickelt werden, da sie noch mindestens einen heterozygot besetzten Markerlocus aufweisen.

Abbildung 4: Theoretische Darstellung der Nutzung von ILs für die Identifizierung und Verifizierung von QTLs am Beispiel des Rohproteingehaltes im Korn.

noch einen Locus. Die durchschnittliche Größe der Wildintrogression beträgt bei diesen insgesamt 44 ILs 21,1 cM. (Spanne: 7,0 - 47,0 cM). Die ILs, die nur noch an einem Markerlocus das Wildallel tragen, dienen dazu, eine Feinkartierung von QTLs durchzuführen, da die Position eines QTL sehr genau eingegrenzt werden kann. Für die Entwicklung eines kompletten Sets von ILs sind diese Linien jedoch nur in geringerem Maße brauchbar, da bei ihnen keine Überlappung der Introgressionen gegeben ist und somit eventuell einige Bereiche des Wildeltermoms nicht repräsentiert werden. In Zukunft wäre es jedoch sinnvoll ein Set mit sehr vielen ILs, die jeweils nur eine sehr kleine Introgression des Wildeltermoms (z.B. 5 cM) tragen, aufzubauen, um die oben genannten Vorteile von Introgressionslinien noch besser zu nutzen. Hierzu bedarf es aber einer wesentlich höheren Markerdichte (z.B. ein Marker/cM), welche eventuell durch die Genotypisierung mit einem SNP-Chip (Illumina 1,5 k Gersten SNP-Chip) erreicht werden könnte.

Für fünf Chromosomenbereiche konnten bisher weder fertige noch potentielle ILs selektiert werden. Um diese Lücken zu schließen, werden für vier Bereiche geeignete BC<sub>3</sub>-Pflanzen, die noch mehr als eine Wildintrogression beinhalten, ein weiteres Mal mit Scarlett zurückgekreuzt (BC<sub>4</sub>). Für einen Bereich auf Chromosom 7H konnte schon in den BC<sub>2</sub>DH-Linien keine pre-IL selektiert werden, so dass hier eine erneute Kreuzung zwischen Kultur- und Wildelterm erforderlich ist. Alternativ könnte sich jedoch nach der Genotypisierung von neuen Markern in dieser Region herausstellen, dass sich die benachbarten ILs tatsächlich bereits überlappen.

Ist in Zukunft ein komplettes Set an ILs vorhanden, soll es der Verifizierung von QTLs aus dem Projekt GABI-Diversity, sowie der Identifizierung neuer QTLs dienen. Hierzu werden, wie in *Abbildung 2* aufgeführt, in 2007 Daten für agronomische Merkmale und für Merkmale der Malzqualität erhoben und diese in Form einer AB-QTL-Analyse mit den Genotypdaten der ILs verrechnet.

In *Abbildung 4* ist das Prinzip der Verifizierung und Identifizierung von QTLs am theoretischen Beispiel des Malzqualitätsmerkmals Rohproteingehalt im Korn dargestellt. Die ILs, die jeweils nur noch eine Introgression des Wildeltermoms tragen, werden mit Hilfe der AB-QTL-Analyse auf signifikante Unterschiede im Rohproteingehalt jeweils im Vergleich zu Scarlett als Kontrolle geprüft. In diesem Beispiel könnte nur für die beiden ILs 1H.1 und 1H.2 ein signifikanter Unterschied gegenüber Scarlett detektiert werden. Der Rohproteingehalt im Korn wäre bei diesen ILs mit 9,0 % signifikant geringer als in Scarlett (10,0 %). Somit hätte das Wildallel hier einen vorteilhaften Effekt auf den Rohproteingehalt von -10,0 %. Aus der Überlappung der ILs könnte abgeleitet werden, dass auf dem Chromosom 1H ein Wildgen in der Region 10 - 20 cM oder alternativ zwei Wildgene in der Region 0 - 20 cM existieren müssten.

## Ausblick

Das fertige IL-Set kann zukünftig vielseitig genutzt werden. So soll es noch im laufenden GABI-Malt-Projekt hinsichtlich der Malzqualität weiter untersucht werden. Hierzu wird zum einen am IPK Gatersleben eine Expressionsanalyse zu verschiedenen Vermälzungszeitpunkten durchgeführt. Zum anderen sollen bei dem Saaten-Union Resistenzlabor SNPs für Kandidatengene der Malzqualität (z.B.  $\alpha$ -Amylasen und  $\beta$ -Glucanase) analysiert werden.

In möglichen Folgeprojekten kann das IL-Set auf verschiedenen Ebenen gegenüber der Kontrolle Scarlett differentiell charakterisiert werden. So können neue Merkmalsstudien, z.B. hinsichtlich abiotischem Stress und Krankheitsresistenzen, durchgeführt werden. Außerdem wäre es sinnvoll, die ILs mit Hilfe von neuen informativen Markern genetisch genauer zu untersuchen. Dies könnte eventuell durch die Genotypisierung mit einem SNP-Chip (Illumina 1,5 k Gersten SNP-Chip) ermöglicht werden. Weiterhin könnten auf der RNA-Ebene Transkriptionsprofile der ILs mit Hilfe eines Affymetrix 22 k Gersten cDNA-

Chips erstellt werden. Das IL-Set könnte auch auf Protein- (2D-PAGE & MALDI-TOF MS) und Metaboliten-Ebene (GC-MS und LC-MS) mit Scarlett verglichen werden. Weitere Nutzungsmöglichkeiten der ILs sind die Charakterisierung vielversprechender Kandidatengene für agronomische Eigenschaften aus Arabidopsis und Reis, sowie die kartengestützte Klonierung von Gersten-QTLs.

## Danksagung

Wir bedanken uns bei dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die finanzielle Unterstützung des GABI (Genomanalyse im Biologischen System Pflanze)-Projektes GABI-Malt (PN: 0313125B).

Ein besonderer Dank gilt Merle Noschinski für ihre ausgezeichnete und verantwortungsvolle technische Assistenz in diesem Projekt.

## Literaturverzeichnis

- ESHED, Y. and D. ZAMIR, 1994: A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *Lycopersicon esculentum* - a tool for fine mapping of genes. *Euphytica* 79 (23):175-179.
- JEUKEN, M.W.J. and P. LINDHOUT, 2004: The development of lettuce backcross inbred lines (BILs) for exploitation of the *Lactuca saligna* (wild lettuce) germplasm. *Theor Appl Genet* 109:394-401.
- VON KORFF, M., H. WANG, J. LÉON and K. PILLEN, 2004: Development of candiade introgression lines using an exotic barley accession (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) as donor. *Theor Appl Genet* 109:1736-1745.
- LIN, S.Y., T. SASAKI and M. YANO, 1998: Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. *Theor Appl Genet* 96:991-1003.
- PESTSOVA, E.G., A. BÖRNER and M.S. RÖDER, 2001: Development of a set of *Triticum aestivum*-*Aegilops tauschii* introgression lines. *Hereditas* 135(2-3):139-143.
- PESTSOVA, E.G., A. BÖRNER and M.S. RÖDER, 2006: Development and QTL assessment of a set of *Triticum aestivum*-*Aegilops tauschii* introgression lines. *Theor Appl Genet* 112:634-647.
- ZAMIR, D., 2001: Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat Rev Genet* 2:983-989.