

## Molekulare Ansätze zur Unterstützung der Gräserzüchtung an der LFL

S. Seefelder und S. Hartmann

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung  
der bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising

### Einleitung

Aufgabe der Gräserzüchtung ist es, der Landwirtschaft Sorten zur Verfügung zu stellen, die an die jeweiligen Standort- und Nutzungsformen mit ihren Resistenz- und Qualitäts- und Ertrageigenschaften möglichst gut angepasst sind. Bedingt durch die sehr unterschiedlichen Nutzungszwecke (Ackerfutterbau, Dauergrünland, Weide) und Standortansprüche spreizen die Eignungsprofile der zugelassenen Sorten bei den verschiedenen Gräsern erwartungsgemäß deutlich.

Viele in der Gräserzüchtung bearbeitete Merkmale sind nur in langwierigen (Ausdauer) oder teuren Prüfungen (Qualität) zu erfassen und damit züchterisch zu verbessern (HARTMANN 2003). Markergestützte Selektionssysteme könnten neben einer Beschleunigung des Zuchtfortschrittes, auch zur Sortendifferenzierung eingesetzt werden. Experimentell oder auch in freiwilligen Absprachen finden bereits Eiweißmarker wie z. B. Isoenzyme oder Speicherproteine (HEIDENREICH 1997) ihre Anwendung. Genauso sind jedoch auch DNA-Marker denkbar. Die ersten „Gen-Karten“ wurden bei Weidelgras bereits erstellt (BERT et al. 1999).

Zur schnelleren Verwirklichung verschiedener Züchtungsziele werden an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft neben den Fruchtarten Getreide, Kartoffel und Hopfen seit kurzer Zeit auch molekulare Methoden zur Unterstützung der Futterpflanzenzüchtung eingesetzt. Hierbei werden im Folgenden zwei Anwendungsbereiche vorgestellt:

- Unterstützung bei aktuell laufenden Kreuzungsprogrammen  
Konkret wurden im Rahmen eines Zuchtprogrammes über die AFLP-Technik einer PCR-basierenden genomanalytischen Methode der Erfolg spezieller Kreuzungen bestätigt. Im Rahmen dieses Programms wurden zur Erhöhung der genetischen Variabilität Kreuzungen über die Artgrenzen hinweg zwischen *Lolium perenne* L. und *Festuca pratensis* L. erstellt. Die resultierenden „*Festulolium*-Nachkommenschaften“ können dem Transfer jeweils gewünschter Eigenschaften über die Artgrenzen hinweg dienen, aber auch eigenständig weitergeführt werden. Bei Projekten mit diesem Ansatz stehen meist folgende Eigenschaftskomplexe im Zentrum der Überlegungen: Bei Wiesenschwingel Krankheitsresistenzen, Kälte- und Trockentoleranz, bei Weidelgras Frohwüchsigkeit und Schnittverträglichkeit.
- Vorarbeiten zur Entwicklung schneller und kostengünstiger Tests zur Überprüfung der Sortenreinheit über DNA-Marker  
Am Beispiel des Wiesenschwingels, mit seinem vergleichsweise übersichtlichen Spektrum an zugelassenen Sorten, sollte über die AFLP- Methode untersucht werden, inwieweit sich verschiedene Sorten molekular voneinander differenzieren lassen.

## Material und Methoden

Um *Festuca pratensis* L. und *Lolium perenne* L. zu kreuzen, wurden die Blüten der Mutterpflanzen unter dem Binokular kastriert (im Regelfall Deutsches Weidelgras, weil leichter kastrierbar) und mit den Bestäuberähren isoliert. Aus den Karyopsen wurden nachfolgend die Embryonen herauspräpariert und *in vitro* zu ganzen Pflanzen regeneriert. Für den molekularen Nachweis der gelungenen Artkreuzung wurden die Nachkommenschaften von 4 Wiesenschwingelpflanzen mit 44 Weidelgraspflanzen sowie die Eltern selbst untersucht.

Zur molekularen Abschätzung der genetischen Diversität verschiedener Wiesenschwingelsorten wurde je 70 Pflanzen der Sorten Cosmolit, Pradel und Preval untersucht.

Für die molekularen Analysen wurde zunächst nach einer bewährten Methode (DOYLE und DOYLE 1990) die genomische DNA aus jungen Blättern isoliert und anschließend die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Der molekulare Datensatz wurde über eine nicht radioaktive AFLP-Analyse nach einem für Hopfen modifizierten Protokoll erstellt (HARTL und SEEFELDER 1998).

Zur Datenanalyse wurde, wie bei den meisten Diversitätsstudien von Nutzpflanzen, auch in der hier vorgestellten Untersuchung ein Verfahren der Distanzmatrixmethoden angewendet. Es handelt sich um das "average-linkage"-Verfahren, auch UPGMA ("unweighted pair group method with arithmetic mean"). Das AFLP-Bandenmuster wurde zunächst in eine binäre Datenmatrix übertragen. Mit der Software NTSYS-pc (ROHLF 1998) wurden die genetischen Ähnlichkeiten der untersuchten Genotypen bestimmt. Mittels Hauptkomponentenanalyse wurden die Daten gruppiert, um das Ergebnis visuell leichter zugänglich zu machen.

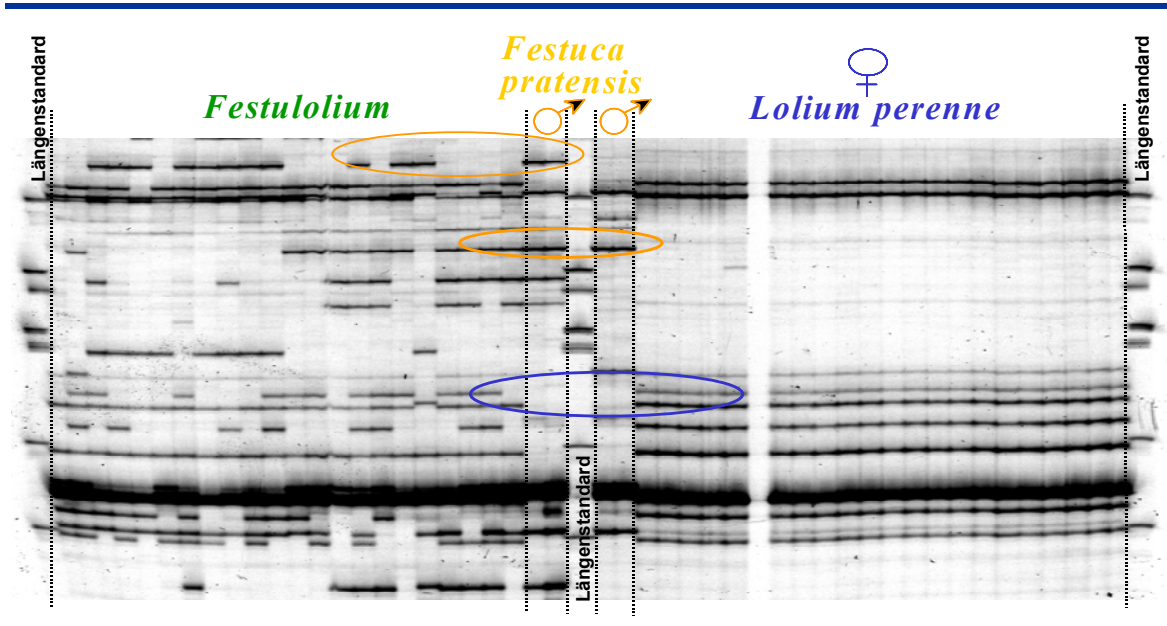
## Ergebnisse und Diskussion

Im Zuge der AFLP-Untersuchungen konnten in den *Festulolium* -Nachkommenschaften eindeutig DNA-Banden sowohl aus dem Genom von *Festuca pratensis* L. als auch von *Lolium perenne* L. nachgewiesen werden. Damit konnte die erfolgreiche Kreuzung über die Artgrenzen hinweg verifiziert werden (Abb. 1). Zur molekularen Charakterisierung der Eltern und der 44 Kreuzungsnachkommen wurden insgesamt 6 AFLP-Primerkombinationen eingesetzt. Von insgesamt 326 polymorphen Fragmenten wurden 162 zur Erstellung einer binären Datenmatrix verwendet. In der zweidimensionalen Darstellung der genetischen Verwandtschaft der Eltern sind die geprüften *Festulolium* -Individuen bzgl. ihrer genetischen Ähnlichkeit zwischen den beiden Kreuzungspartnern einzuordnen (Abb. 2). Nach der Kontrolle der erfolgreichen Kreuzung wird die Untersuchung auf Fertilität der *Festulolium* - Nachkommenschaften der nächste wichtige Punkt beim Aufbau einer Züchtungspopulation sein.

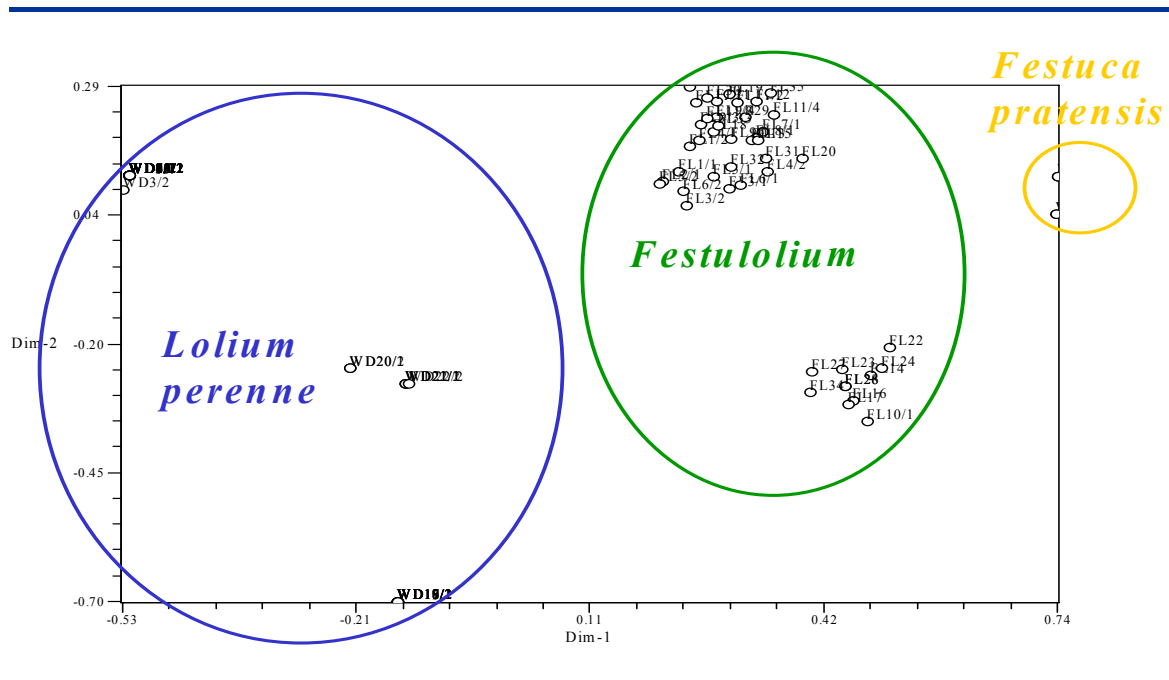
Für die Differenzierung der Wiesenschwingelsorten Cosmolit, Pradel und Preval wurden je 70 Linien der einzelnen Sorten mit insgesamt 10 AFLP-Primerkombinationen untersucht. Von den insgesamt 624 Fragmenten wurden 110 sehr gut reproduzierbare polymorphe Banden ausgewertet. In den verwendeten Sorten konnten bereits durch diesem kleinen Ansatz DNA-Banden gefunden werden, die in diesem Rahmen spezifisch waren. Bei diesen DNA-Fragmenten handelt es sich also um „Marker“, die in Individuen der zu beschreibenden Sorte zu finden waren, in den anderen Sorten jedoch nicht (Beispiel Abb. 3).

Ausgehend vom Ergebnis dieses Tastversuches stellen sich folgende Fragen:

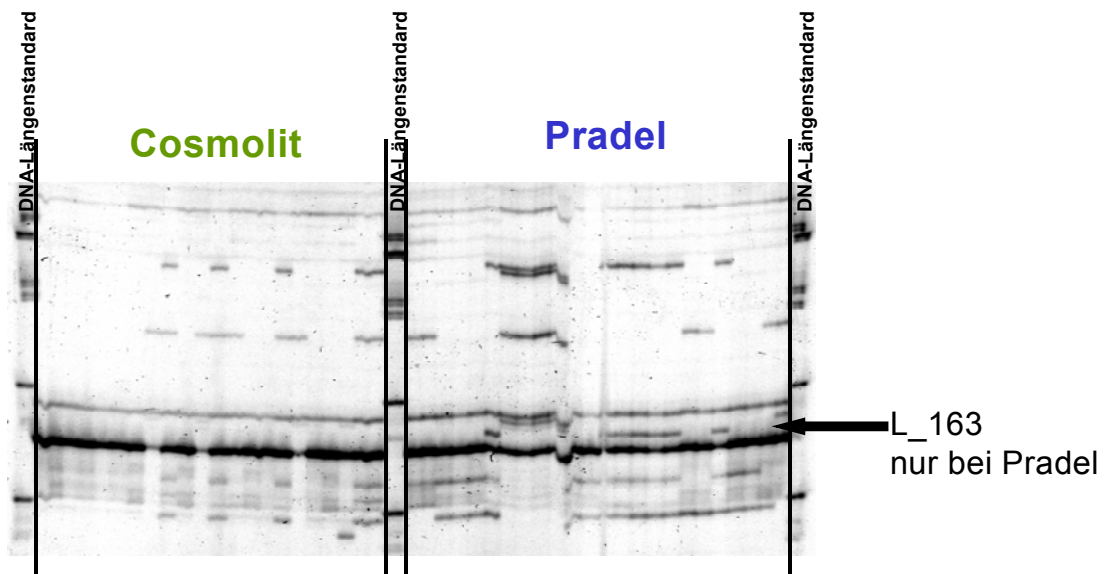
- Inwieweit sind diese „Marker“ im Rahmen der Differenzierung eines erweiterten Sortenspektrums zu ergänzen?
- In welchem Rahmen müssen Toleranzen für den natürlichen Schwankungsbereich der Bandenfrequenzen zwischen verschiedenen Chargen einer Sorte beim Windbestäuber Wiesenschwingel für eine Sortenabgrenzung beachtet werden?



**Abb. 1:** Bestätigung der erfolgreiche Artkreuzung zwischen Wiesenschwingel und Deutschem Weidelgras über AFLP



**Abb. 2:** Zweidimensionales Darstellung einer Hauptkomponentenanalyse der Kreuzungseltern und der Nachkommenschaft einer Kreuzung von Deutschem Weidelgras und Wiesenschwingel



**Abb. 3:** AFLP-„Marker“ L\_163 zur Identifizierung der Sorte Pradel

## Literatur

- BERT, P.F., CHARMET, G., SOURDILLE, P., HAYWARD, M.D. und BALFOURIER, F. (1999): A high density molecular map for ryegrass using AFLP markers. TAG 99:445-452.
- DICE, L.R. (1945): Measures of the amount of ecological association between species. Ecology 26. 297-302.
- DOYLE, J.J und DOYLE J.L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 1990, 12: 13-15.
- HARTL, L. und SEEFELDER, S. (1998): Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs Theor. Appl. Genet. 96: 112-116.
- HARTMANN, S. (2003): Improvement of persistence in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under the specific environmental conditions of Bavaria as an example of an integrated concept at the Bavarian Research Center for Agronomy; International Symposium on Grass Breeding of EUCARPIA (European Association for Research on Plant breeding) - Fodder Crops and Amenity Grasses Section; Vorträge für Pflanzenzüchtung Bd. 59, 54-57.
- HEIDENREICH, S.C. (1997): Untersuchungen zur Nachprüfung von Sortenmischungen des Deutschen Weidelgrases (*Lolium perenne* L.) am Saatgut mittels Elektrophorese der Speicherproteine. Diss., Universität Hohenheim.
- ROHLF, F.J. (1998): NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.0. Exeter Software, Setauket, N. Y..