



Molekulare Marker in der Weizenzüchtung

Beat KELLER, Monika MESSMER, Catherine FEUILLET, Hans WINZELER, Michael WINZELER und Gabriele SCHACHERMAYR, Eidgenössische Forschungsanstalt für landwirtschaftlichen Pflanzenbau, Reckenholz (FAP), CH-8046 Zürich

Die Ansprüche an neue Weizensorten sind in den letzten Jahren gestiegen: Neben mindestens gleich guten agronomischen Eigenschaften werden bei neuen Sorten verbesserte Resistenzen und hohe Qualität verlangt. Zur Erreichung dieser Zuchtziele werden heute vermehrt auch biotechnologische Verfahren gebraucht. Hier soll die Anwendung von molekularen Markern beschrieben werden. Diese ermöglichen es, einzelne Gene mit Labormethoden effizient nachzuweisen.

In der Züchtung werden Pflanzen mit den gewünschten Eigenschaften aufgrund der äusseren Erscheinung und messbarer Merkmale, des sogenannten Phänotyps, ausgewählt. Der Phänotyp als sichtbare Ausprägung eines Merkmals (z.B. Pflanzenlänge oder Braunrostresistenz) wird durch den Genotyp (die in der DNA festgelegte Erbinformation) sowie durch Umwelteinflüsse bedingt. Oft würde es die züchterische Arbeit erleichtern, wenn direkt der gewünschte Genotyp ausgewählt werden könnte. Dadurch würden die umweltbedingten (Wetter in einer Wachstumsaison, Boden am Versuchsstandort usw.) und deshalb nicht vererbaren Unterschiede in der Ausprägung eines Genotyps ausgeschaltet und eine effizientere Selektion möglich.

Was sind molekulare Marker?

Neue, gentechnische Methoden haben es ermöglicht, die An- oder Abwesenheit von einzelnen Resistenzgenen direkt auf der Ebene der Erbsubstanz nachzuweisen (DNA-Marker oder molekulare Marker). Damit können umweltabhängige und arbeitsaufwendige Resistenznachweise auf dem Feld ergänzt oder ersetzt werden. Beim Nachweis eines Gens mit einem molekularen Marker wird nicht das Gen direkt bestimmt, sondern ein Stück Erbmateriale, das immer oder sehr häufig mit dem Gen zusammen vererbt wird (also genetisch nahe bei dem Resistenzgen liegt, s. Abb. 1). Auch ohne das Gen direkt nachzuweisen, wird also eine Selektion für den gewünschten Genotyp möglich. Es ist wahrscheinlich, dass in Zukunft die An- oder Abwesenheit der Gene, die für

eine interessante Erbeigenschaft verantwortlich sind, direkt nachgewiesen werden kann. Da das Weizen genom aber sehr gross ist (15 Milliarden Basenpaare, das

menschliche Genom z.B. besteht nur aus 3 Milliarden Basenpaaren) und zudem von jedem Gen mindestens drei Kopien vorhanden sind (Weizen ist hexaploid, d.h. enthält drei vollständige Genome), ist die Isolation von Genen für agronomisch wichtige Eigenschaften noch oft ein Wunschtraum. Bis zu dessen Realisierung wird weiterhin sehr viel Forschung über das Weizen genom nötig sein, und molekulare Marker werden deshalb noch lange ein wichtiges Werkzeug bleiben.

Chromosom 6B

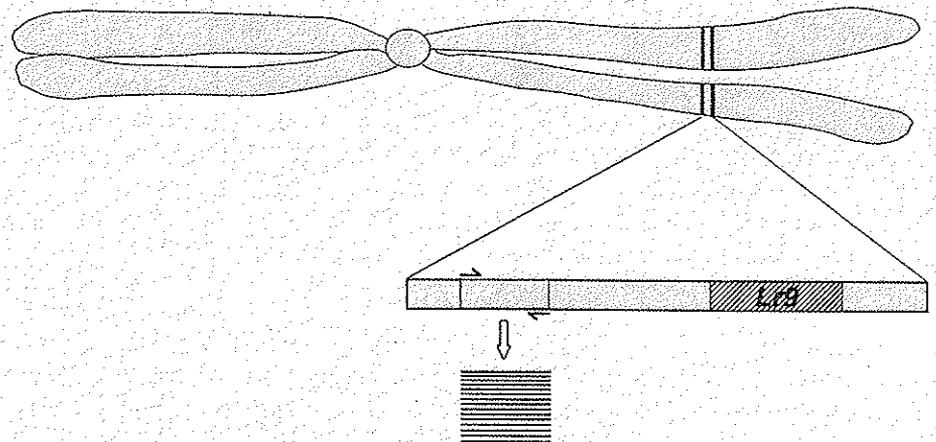


Abb. 1. Genetische Marker auf der Ebene des Erbmateriale (DNA-Marker, molekulare Marker). Die Abbildung zeigt ein Chromosom mit kurzem und langem Arm. Ein kleiner Abschnitt des langen Chromosomenarmes ist vergrössert dargestellt. Zwei Abschnitte von DNA auf dieser Vergrösserung sind hervorgehoben: Schraffiert ist das Gen, das den Züchter interessiert (z.B. Resistenzgen), mit zwei Pfeilen angedeutet ist der DNA-Abschnitt, der durch die PCR vermehrt wird und als Marker für das agronomisch interessante Gen dient.

Lexikon

DNA	Desoxyribonucleinsäure (Träger der Erbinformation)
Gen	Erbfaktor. Teilweise oder vollständig verantwortlich für ein Erbmerkmal
Genom	Summe der Erbanlagen in einer Zelle
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion. Erlaubt die biochemische Vermehrung von spezifischen DNA-Fragmenten aus kleinsten Mengen von DNA.
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus. Technik, die es erlaubt, molekulare Unterschiede zwischen Zuchtstämmen festzustellen.
Pyramidisierung	Die Kombination von zwei oder mehr Resistenzgenen im gleichen Zuchtstamm. Damit soll die Dauerhaftigkeit der Resistenz erhöht werden.

Es gibt heute zwei gebräuchliche Methoden, spezifische DNA-Sequenzen als molekulare Marker zu nutzen und einfach nachzuweisen. Die erste Methode beruht auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dieses Verfahren soll hier nicht näher beschrieben werden. Es wurde kürzlich in dieser Zeitschrift im Detail vorgestellt (Dubois und Jenny 1994; Vögeli *et al.* 1994). PCR erlaubt es, kleinste Mengen eines bestimmten Erbschnitts vieltausendfach zu vermehren und dann mit geeigneten Methoden «sichtbar» zu machen (Abb. 1). Die zweite Methode bedient sich einer komplexen und schwierigen Technik, mit der Unterschiede direkt im Erbmaterial mit sehr sensitiven Techniken (radioaktive Isotope) nachgewiesen werden können (RFLP-Methode: Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus).

Anwendungsbereiche von Markern

Die meisten Eigenschaften (z.B. Ertrag, Backqualität oder Toleranz gegen Spelzenbräune) werden durch mehrere Gene beeinflusst. Hingegen gibt es auch Eigenschaften, die nur durch ein Gen bedingt sind. Dazu gehören bei Weizen Krankheitsresistenzen gegen Braunrost und Halmbruch. Gegenwärtig gibt es genetische Marker für solche einfach vererbten Eigenschaften. Es laufen aber Forschungsprojekte zur Suche nach Markern für Gene, die an komplexen Erbeigenschaften beteiligt sind.

In unseren Arbeiten brauchen wir molekulare Marker zur Charakterisierung der genetischen Vielfalt im Weizenzuchtma-

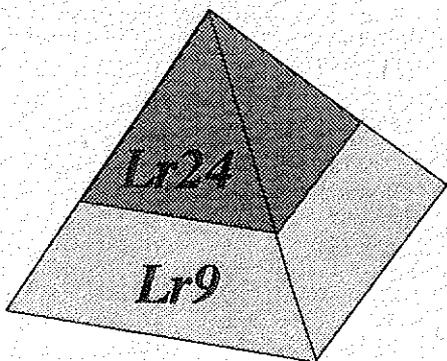


Abb. 2. Schematische Darstellung der Pyramidisierung von Resistenzgenen als Strategie in der Resistenzzüchtung. In unserem Zuchtprogramm wollen wir die beiden Braunrostresistenzgene *Lr9* und *Lr24* in die gleiche Sorte einkreuzen, um eine dauerhaftere Resistenz zu erreichen.

Anwendungen von genetischen Markern in der Weizenzüchtung und Weizenbiotechnologie

- Analyse der genetischen Vielfalt im Zuchtmaterial. Abstammungsanalysen von wichtigen Zuchtstämmen (Siedler *et al.* 1994).
- Rückkreuzungsprogramme: Einkreuzen eines Gens, zum Beispiel aus einem Wildgras, in den gewünschten genetischen Hintergrund einer für die Schweiz geeigneten Sorte durch markergestützte Selektion auf den gewünschten Genotyp.
- Pyramidisierung von Resistenzgenen (siehe Text).
- Genetische Analyse von quantitativ vererbten Merkmalen (zum Beispiel Backqualität oder Resistenz gegen die Spelzenbräune). Identifizierung von molekularen Markern für Gene, die an solchen Merkmalen beteiligt sind.
- Identifizierung von Sorten, Qualitätskontrolle von Saatgut und Nahrungsmitteln, Analyse von Mischungen.

terial (Siedler *et al.* 1994). Zudem entwickelten wir in den letzten Jahren genetische Marker für mehrere Resistenzgene gegen Braunrost in Weizen (Schachermayr *et al.* 1994; Winzeler *et al.* 1994; Schachermayr *et al.* 1995). Das Ziel dieser Arbeiten ist es, Methoden zu finden die es ermöglichen, mehrere Resistenzgene gegen Braunrost in der gleichen Sorte zu kombinieren. Dies soll es dem Krankheitserreger erschweren, sich an die Resistenz anzupassen, wie das häufig vorkommt, wenn nur einzelne Resistenzgene vorhanden sind. In der Vergangenheit basierte die Krankheitsresistenz einer Sorte oft auf nur einem Gen. Es gibt viele Beispiele dafür, dass nach wenigen Jahren grossflächigen Anbaus die Resistenz zusammengebrochen ist und der Krankheitserreger sich an das Resistenzgen angepasst hat. Die Kombination mehrerer Gene gegen die gleiche Krankheit wird Pyramidisierung der Resistenzen genannt (Abb. 2). Dadurch streben wir in unserem Zuchtprogramm eine dauerhafte Braunrostresistenz an. Bis heute war es sehr schwierig oder unmöglich, die Strategie der Resistenzgenpyramidisierung in der Züchtung anzuwenden. Ein Weizenzuchtstamm, der ein Braunrostresistenzgen besitzt, ist in den normalen Feldprüfungen des Zuchtprogramms genauso resistent wie ein Zuchtstamm, der zwei Gene besitzt. Nur durch aufwendige Prüfungen der Nachkommen könnte man feststellen, ob ein, zwei oder mehr Resistenzgene vorhanden sind. Ein solcher Aufwand ist aber in einem praktischen Zuchtprogramm mit vielen hundert Zuchtstämmen nicht möglich. Neben der Nutzung von genetischen Markern zur Pyramidisierung von Resi-

stenzgenen werden sie in der Weizenzüchtung zusätzlich für verschiedene andere Bereiche eingesetzt (s. Kasten).

Marker für das Braunrostresistenzgen *Lr9*

Durch den Vergleich von anfälligen und resistenten Weizenlinien konnten wir Marker für das Braunrostresistenzgen *Lr9* (Schachermayr *et al.* 1994) finden. Zwei kurze, einzelsträngige DNA-Sequenzen (sogenannte Primer) führen in der PCR zur Vermehrung eines DNA-Fragments von 1100 Basenpaaren. Dieses Fragment kann nach einer Agarose-Gelelektrophorese durch eine DNA-spezifische Färbung sichtbar gemacht werden. Die Marker auf PCR-Basis sind genetisch sehr eng mit dem *Lr9* Resistenzgen gekoppelt: In mehr als 150 Nachkommenpflanzen einer Kreuzung war die Anwesenheit des Resistenzgens (bestimmt durch einen Keimlingstest mit Braunrostinfektion) immer mit der Anwesenheit des PCR-Markers verbunden. Diese enge Bindung des Markers mit *Lr9* wurde nachgewiesen in einer Kreuzung zwischen einem braunrostanfälligen Elternteil und einem Elternteil, dessen Resistenz gegen Braunrost ausschliesslich auf dem *Lr9* Resistenzgen beruht. Alle resistenten Nachkommenpflanzen produzierten in der PCR das spezifische Fragment, während alle anfälligen Pflanzen dieses Fragment nicht produzierten. Für das *Lr9* Resistenzgen stehen jetzt sowohl Marker auf PCR-Basis wie auch RFLP-Marker zur Verfügung (Schachermayr *et al.* 1994).

Mit diesem Nachweis kann das *Lr9* Gen mit grosser Sicherheit in jeder beliebigen

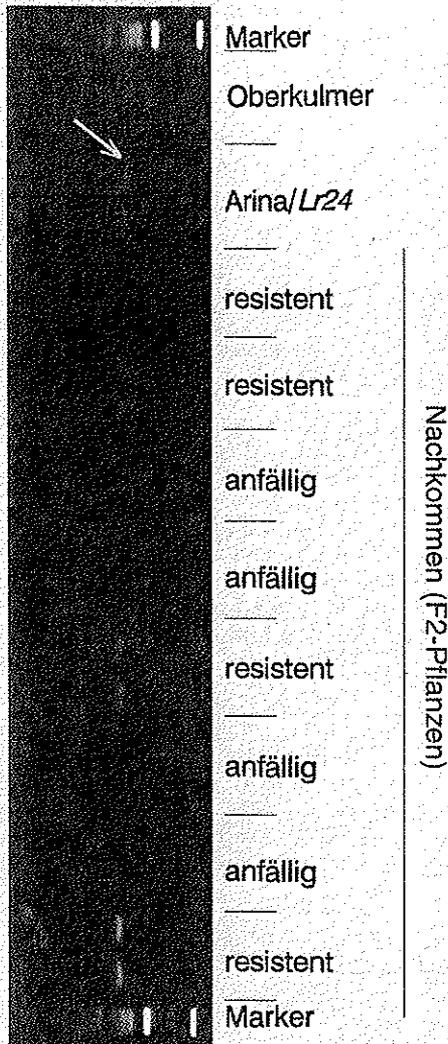


Abb. 3. Molekularer Marker für das *Lr24* Braunrostresistenzgen auf PCR-Basis. Die Abbildung zeigt die durch PCR-Vermehrung entstandenen DNA-Fragmente aus zwei Weizensorten, die als Eltern einer Kreuzung dienten (*Arina/Lr24* und *Oberkulmer*) sowie die Resultate des Tests von Nachkommenspflanzen. Das mit einem Pfeil bezeichnete Fragment ist nur in Pflanzen vorhanden, die das *Lr24* Gen enthalten. Die Anwesenheit dieses Fragments korreliert immer mit der Braunrostresistenz, die durch *Lr24* vererbt wird.

Pflanze im Weizenzuchtmaterial festgestellt werden. Der PCR-Test für dieses Gen ist sehr spezifisch. Nur Weizenlinien mit diesem Gen zeigen nach der PCR das spezifische Fragment. Wir haben über 100 Weizenlinien vor allem aus Europa, aber auch aus Nord- und Südamerika auf die Anwesenheit dieses Fragments getestet. Nur in den Linien, die bekanntermassen das *Lr9* enthalten, wurde das Fragment festgestellt. Dieser einfache Nachweis kann im wesentlichen auf die qualitative Frage reduziert werden: Ist das Fragment vorhanden (ja/nein). Damit eignet er sich auch für eine zukünftige Automatisierung. Wir werden in der nächsten Zeit versuchen, eine effiziente Testmethode

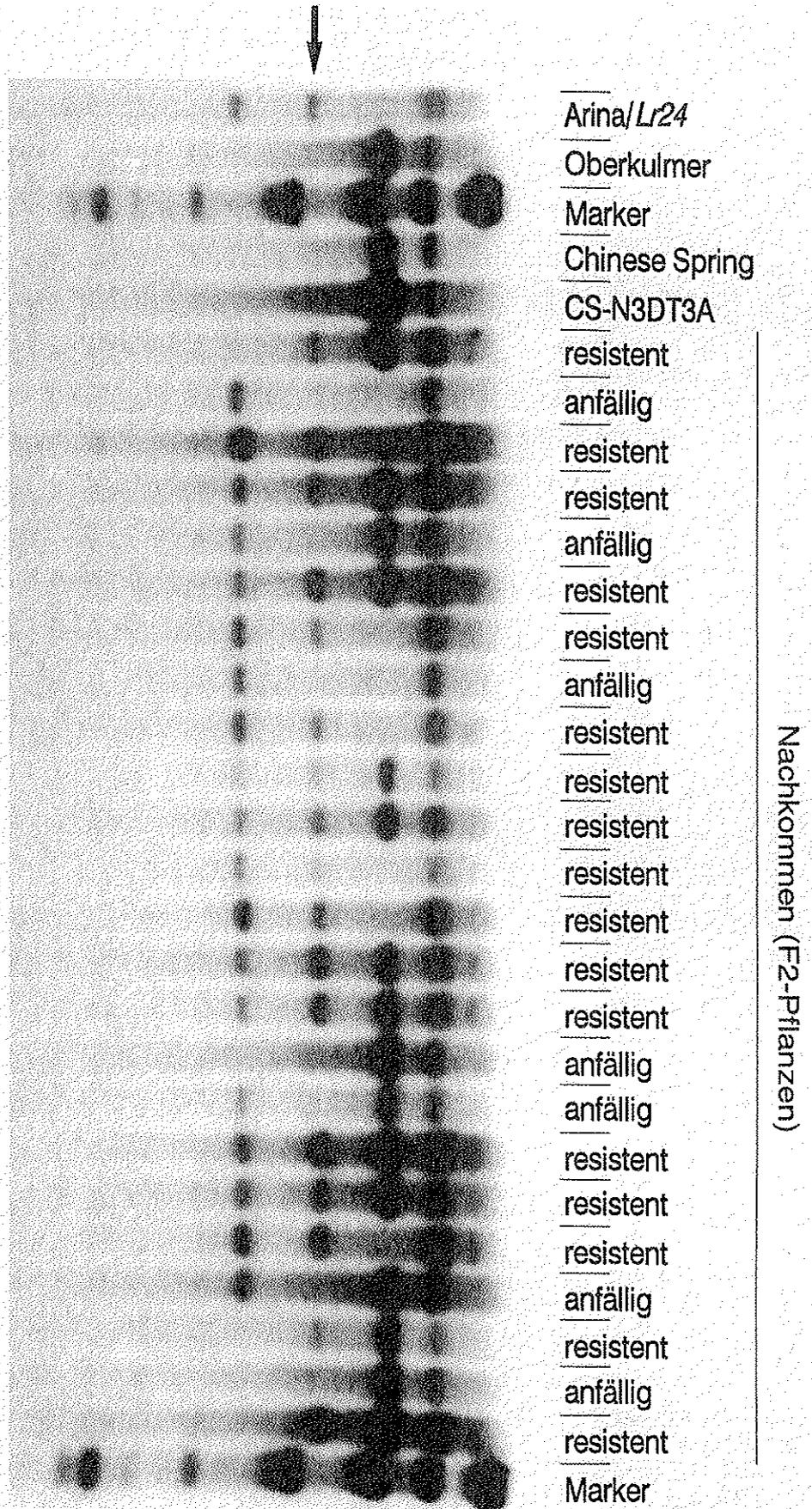


Abb. 4. Molekularer Marker für das *Lr24* Braunrostresistenzgen auf RFLP-Basis. Dieser RFLP-Marker zeigt in allen Pflanzen, die das Resistenzgen haben, eine zusätzliche Bande. Diese ist mit einem Pfeil markiert. Ihre Anwesenheit ist immer mit dem Resistenzgen *Lr24* korreliert. Dies kann an den Nachkommenpflanzen einer Kreuzung studiert werden. Diese Nachkommen wurden unabhängig vom Labortest mit dem molekularen Marker als Keimlinge mit Braunrost infiziert, um ihre Resistenz festzustellen. Ganz oben sind einige zusätzliche Weizenlinien gezeigt, darunter die Eltern der Kreuzung «*Arina/Lr24*» (resistent) und «*Oberkulmer*» (anfällig).

für eine grössere Anzahl Pflanzen zu entwickeln.

Marker für das Braunrostresistenzgen *Lr24*

Ganz ähnlich wie für das Gen *Lr9* sind wir für *Lr24* vorgegangen. Auch hier war es möglich, einen effizienten Nachweis des Gens (das ursprünglich aus dem Wildgras *Agropyron elongatum* kommt) sowohl auf PCR-Basis (Abb. 3) als auch verschiedene RFLP-Marker zu entwickeln (Schachermayr *et al.* 1995). Die getesteten Marker wurden in unseren Analysen immer zusammen mit dem *Lr24* Resistenzgen vererbt und erlauben es deshalb, aus ihrer Anwesenheit auf die Präsenz des *Lr24* Gens zu schliessen. Abbildung 4 zeigt einen dominanten RFLP Marker, der zusammen mit *Lr24* vererbt wird. Für die praktische Anwendung werden wir aus arbeitstechnischen Gründen vor allem den PCR-Marker benutzen.

Pyramidisierung von *Lr9* und *Lr24*

Damit verfügen wir über die molekularen Marker, die zur Kombination der beiden Resistenzgene *Lr9* und *Lr24* in der gleichen Weizenlinie nötig sind. Zusätzlich haben wir einen Isozym-Marker für das *Lr19* Gen (Winzeler *et al.* 1994) gefunden. 1994 wurden die ersten Kreuzungen gemacht mit dem Ziel, Sorten mit der Kombination von drei verschiedenen Braunrostresistenzgenen zu züchten.

Internationale Zusammenarbeit

Ein Forschungsschwerpunkt, neben der Suche nach praktisch anwendbaren Markern, ist die methodische Weiterentwicklung bestehender Markersysteme. Es gibt nach wie vor zu wenig genetische Marker für Weizen, die in züchterisch wertvollem Material genetische Unterschiede feststellen können. Damit ist die Identifikation vieler agronomisch wichtiger Gene noch nicht möglich. Es wird aber intensiv an neuen Techniken gearbeitet und es ist absehbar, dass sich in den nächsten Jahren die Möglichkeiten auf dem Gebiet der genetischen Marker stark vergrössern werden. In dieser Situation ist der Zugang zu Informationen immer wichti-

ger. Für die Weizengenetik hat das USDA (U.S. Department of Agriculture) eine Datenbank aufgebaut, die über die gebräuchlichen wissenschaftlichen Computernetzwerke zugänglich ist. Ein freier Informationsaustausch über genetische Marker in dieser Datenbank wird weltweit die Umsetzung des neuen Wissens in die Züchtungsarbeit erleichtern und auch in Entwicklungsländern ermöglichen. Angesichts der Herausforderungen der Weltenernährungssituation an die Weizenzüchtung sind solche Vernetzungsanstrengungen zu begrüessen.

Ausblick

Mit der Entwicklung von Markern für eine wachsende Zahl von Weizengenen stehen für die Züchtungsforschung zwei neue Aufgaben an: Zum Ersten gilt es, die entwickelten Nachweismethoden für die Marker zu optimieren und grösstmögliche Effizienz zu erreichen. Zum andern muss versucht werden, die ständig steigende Zahl von Markern für Weizengene im Zuchtprogramm möglichst sinnvoll einzusetzen. Diese Probleme können nur gelöst werden, wenn in Forschungsgruppen ZüchterInnen, BiotechnologenInnen und ZüchtungsforscherInnen eng zusammenarbeiten.

DANK

Die Forschungsarbeiten wurden durch das Schwerpunktprogramm Biotechnologie des Schweizerischen Nationalfonds unterstützt (Projekt Nr. 5002-034559).

LITERATUR

- Dubois D. und Jenny E. 1994. PCR-Methode zur Diagnose von Pflanzenviren. *Agrarforschung* 1 (9), 415-418.
- Schachermayr G., Siedler H., Gale M.D., Winzeler H., Winzeler M. and Keller B., 1994. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 88, 110-115.
- Schachermayr G.M., Messmer M.M., Feuillet C., Winzeler H., Winzeler M. and Keller B., 1995. Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, in press.
- Siedler H., Messmer M., Schachermayr G., Winzeler H., Winzeler M. and Keller B., 1994. Genetic diversity in European wheat and spelt breeding material based on RFLP data. *Theor. Appl. Genet.* 88, 994-1003.

Vögel P., Fries H.-R., Bolt R. und Stranzinger G., 1994. Der MHS-Test: ein Durchbruch im Kampf gegen das Schweinestress-Syndrom. *Agrarforschung* 1 (2), 93-96.

Winzeler M., Winzeler H. and Keller B., 1994. Endopeptidase polymorphism and linkage of the *Ep-D1c* null allele with the *Lr19* leaf rust resistance gene in hexaploid wheat. *Plant Breeding* 113, in press.

RÉSUMÉ

Utilisation de marqueurs génétiques dans la sélection du blé

Les marqueurs génétiques sont utilisés en sélection du blé, dans les programmes de rétrocroisements, pour analyser la diversité génétique, identifier les variétés et combiner les gènes de résistances. Nous avons identifié, par PCR, des marqueurs moléculaires liés à deux gènes de résistance à la rouille des feuilles du blé, *Lr9* et *Lr24*. Des marqueurs RFLP ont également été identifiés pour ces deux gènes, ainsi qu'un marqueur isozymique pour le gène *Lr19*. Les marqueurs génétiques associés à ces trois gènes *Lr* faciliteront leur combinaison et devraient par conséquent permettre d'améliorer la sélection pour une résistance durable contre la rouille des feuilles.

SUMMARY

Genetic markers in wheat breeding

Genetic markers are used in wheat breeding in backcrossing programs, for the analysis of genetic diversity, for the identification of varieties and for pyramiding resistance genes. We have found PCR-based molecular markers for the two leaf rust disease resistance genes *Lr9* and *Lr24* of wheat. In addition, RFLP markers for both genes were found. Together with an isozyme marker for the *Lr19* gene, the genetic markers for these three *Lr* genes will facilitate pyramiding them and thus improve breeding for durable resistance against leaf rust.

KEY WORDS: genetic markers, molecular markers, leaf rust, wheat