

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Übersicht

Inzuchtlinien des Welschen Weidelgrases wurden 1999 von der DSV (Deutsche Saatveredelung Lippstadt-Bremen GmbH) erstellt und für dieses Projekt zur Verfügung gestellt. Mit ausgewählten Einzelpflanzen dieser Inzuchtlinien wurden Pärchenkreuzungen durchgeführt und einige dieser Kreuzungen dienten der Herstellung synthetischer Sorten (Synthetiks). An einem anderen Ort standen weitere Genotypen dieser Inzuchtlinien in einer Topcrossanlage, von denen Topcrosssaatgut geerntet wurde. Inzuchtlinien, Kreuzungen und Topcross-Nachkommenschaften wurden einzelpflanzenweise und in Parzellen zum Teil mehrortig geprüft. Von Inzuchtlinien, die 1998 erstellt worden waren (ebenfalls DSV), wurden die Topcross-Nachkommen analysiert. Eine Übersicht über die durchgeführten Arbeiten in den einzelnen Jahren ist in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Darstellung des Arbeitsplans für die Feldversuche

Jahr	Inzuchtlinien (1998)	Inzuchtlinien (1999)			Kreuzung
	Topcross-Nachkommen	Inzuchtlinien	Topcross-Nachkommen	Kreuzung	Synthetiks
2000	- EP (1) - P (1)	- EP (2) - Verklonung von Kreuzungseltern	-	- Ährenkreuzungen mit Inzuchtlinien (ÄK)	-
2001	-	- Isoenzymtest - EP der Klone (3)	- EP (1)	- Vermehrung (ÄK) - Isoenzymtest - EP (2) - Ganzpflanzenkreuzungen (GK)	- Zusammenstellung aus Kreuzungen
2002	-	- EP ausgewählter Inzuchtlinien (1)	- P (1)	- P (ÄK; 1) - Vermehrung (GK)	- Vermehrung
2003	-	-	-	- P (GK; 2)	- P (2)

EP – Einzelpflanzenprüfung, P – Parzellenprüfung, (1)..(3) – Anzahl Orte, an denen Merkmale erfasst wurden

3.1.2 Inzuchtlinien

76 potentielle Inzuchtlinien (Selbstungsnachkommenschaften von Einzelpflanzen) von 16 Abstammungen, bei denen es sich um Zuchtstämme und Sorten des Welschen Weidelgrases (*Lolium multiflorum* L.) mit 8-19 Einzelpflanzen handelte, wurden von der DSV im Herbst 1999 übernommen. 65 Inzuchtlinien (Nr. 30 – 1304 und 2 – 76), auch als 99-er Inzuchtlinien

bezeichnet, sind in Tab. 2 aufgeführt. Ebenfalls in Tab. 2 stehen ‚Avance‘, ‚Baltimore‘, ‚Dasas‘, ‚Fastyl‘ und ‚Rustyl‘, die keine Inzuchtlinien sind. Außerdem gibt es die Inzuchtlinien S5 bis S45, bei denen es sich um Selbstungsnachkommenschaften von *L. perenne* handelt. Neben der Kennzeichnung des Materials über Bezeichnung (Inzuchtlinien) und der Abstammung (Sorte, Zuchtstamm), der die Inzuchtlinie angehörte, sind die Art, Ploidiestufe, Züchter und das Herkunftsland angegeben. Ebenfalls ist die Anzahl an Einzelpflanzen aufgeführt, die je Linie bzw. Sorte mit Isoenzymssystemen, molekularen Markern (AFLPs, STS, genomischen (G *ssr*) und EST-abgeleiteten (E *ssr*) Mikrosatelliten), phänotypischen Merkmalen und/oder auf Rostanfälligkeit im Labor getestet wurden. Aus den letzten drei Spalten wird ersichtlich, welche Inzuchtlinien in Thüle (Versuchsstation der DSV) in einer Topcross-Anlage (abgekürzt: TH) standen. Von welchen Inzuchtlinien Topcross-Saatgut geerntet und Einzelpflanzen geprüft wurde, ist in Spalte Topcross - EP mit einem X gekennzeichnet. Die fünf Topcross-Nachkommenschaften, die auch in Parzellen geprüft wurden, stehen in der letzten Spalte ebenfalls mit einem X markiert unter Topcross - P.

Im Oktober 1999 wurden die von der DSV gelieferten 76 Inzuchtlinien mit 8-19 Einzelpflanzen, in Hohenthurm auf dem Versuchsfeld ausgepflanzt (Reihenabstand: 40 cm, Einzelpflanzen-abstand innerhalb der Reihe: 25 cm) und im folgenden Jahr phänotypisch charakterisiert. Diese 76 Inzuchtlinien wurden zu Beginn des Jahres 2001 mit Isoenzymen auf fremde Allele untersucht und unreine Linien verworfen, so dass 65 Inzuchtlinien für die Analysen zur Verfügung standen. Weitere Genotypen dieser Inzuchtlinien standen in Topcross-Anlagen in Thüle und blühten gemeinsam entweder mit den Bestäuberpopulationen ‚Fastyl‘ oder ‚Ligrande‘ ab.

Ingezüchtete Einzelpflanzen, die Kreuzungseltern gewesen waren, wurden im Juli 2000 verklont und jeweils zwei Klone in zwei Wiederholungen (Einzelpflanzenabstand: 40 x 40 cm) in Hohenthurm ins Feld gepflanzt. Ein weiterer Klon je Kreuzungselter wurde aus Sicherheitsgründen getopft, aufgrund der Wüchsigkeit aber im Oktober 2000 erneut verklont. Diese zwei Klone je Kreuzungselter konnten im April 2001 auf einem weiteren Versuchsstandort (Kühnfeld in Halle) ausgepflanzt werden (Einzelpflanzenabstand: 50 x 50 cm).

Tab. 2: Beschreibung von Inzuchtlinien des Deutschen Weidelgrases, des Welschen Weidelgrases und fünf Sorten

Inzuchtlinien														Topcross	
Na-me	Abstam-mung	Art	Ploi-die	Züchter	Her-kunft	Isoen-zym	AF-LP	STS	G ssr	E ssr	Rost	Phäno-typ	TH ¹	EP	P
S5	„Gilford“	Lp	2x	Dani	IR	11	.	.	11	.	30
S8	„Orleans“	Lp	2x	Cebeco	NL	11	.	.	11	.	30
S10	„Tyrone“	Lp	2x	Dani	IR	11	.	.	11	.	30
S12	„Umbria“	Lp	2x	Cebeco	NL	11	.	.	11	.	30
S16	„Nelson“	Lp	2x	DLF	DK	11	.	.	11	.	27
S26	„Lasso“	Lp	2x	DLF	DK	11	.	.	11	.	24
S45	„Magyar“	Lp	2x	Zelder	NL	11	96	96	96	96	30 (84)	84	.	X	.
30	50107	Lm	2x	DSV	D	10	8	.	8	.	20	16 (6)	X	X	.
64	„Meribel“	Lm	2x	IGER	GB	10	8	.	8	.	20	20 (5)	X	X	.
116	„Trajan“	Lm	2x	RvP	B	10	8	.	8	.	20	20 (8)	X	X	X
221	41215	Lm	2x	DSV	D	10	8	.	8	.	20	20 (6)	X	X	.
286	40400	Lm	2x	DSV	D	10	8	.	8	.	20	15 (5)	X	.	.
398	40400	Lm	2x	DSV	D	10	8	.	8	.	20	18 (3)	.	X	.
423	41214	Lm	2x	DSV	D	10	.	.	8	.	20	19 (4)	X	.	.
472	„Trajan“	Lm	2x	RvP	B	10	.	.	8	.	20	19	.	.	.
634	403a	Lm	2x	DSV	D	10	.	.	8	.	20	19	X	X	.
1063	„Fastyl“	Lm	2x	RAGT	F	10	.	.	8	.	20	20 (7)	X	X	.
1073	„Cavour“	Lm	2x	Carneau	F	10	.	.	8	.	20	14 (5)	X	X	.
1304	40400	Lm	2x	DSV	D	10	.	.	8	.	20	20 (8)	X	X	.
2	41214	Lm	2x	DSV	D	10	19	X	X	.
4	403a	Lm	2x	DSV	D	10	18	X	X	.
6	40400	Lm	2x	DSV	D	10	18	X	.	.
9	„Silor“	Lm	2x	Semunion	F	10	19	.	X	.
10	40400	Lm	2x	DSV	D	10	20	X	X	.
11	„Cavour“	Lm	2x	Carneau	F	10	18	X	.	.
14	41813	Lm	2x	DSV	D	10	14	.	X	.
15	40107	Lm	2x	DSV	D	10	18	X	X	.
16	50107	Lm	2x	DSV	D	10	19	X	X	.
17	50404	Lm	2x	DSV	D	10	20	X	X	.
19	„Gordo“	Lm	2x	Zelder	NL	10	19	X	.	.
20	„Gordo“	Lm	2x	Zelder	NL	10	20	X	X	.
22	403a	Lm	2x	DSV	D	10	16	X	.	.
25	„Fastyl“	Lm	2x	RAGT	F	10	19	.	X	.
27	411a	Lm	2x	DSV	D	10	20	18	X	X	.
28	411a	Lm	2x	DSV	D	10	20	19	X	.	.
29	„Trajan“	Lm	2x	RvP	B	10	15	X	.	.
30m	„Meribel“	Lm	2x	IGER	GB	10	19	.	X	X
31	41215	Lm	2x	DSV	D	10	19	X	X	.
32	41214	Lm	2x	DSV	D	10	17	X	.	.
33	41215	Lm	2x	DSV	D	10	19	.	X	X
34	40400	Lm	2x	DSV	D	10	13	X	X	.
35	„Meribel“	Lm	2x	IGER	GB	10	19	X	X	.
36	41215	Lm	2x	DSV	D	10	18	X	X	.
37	41215	Lm	2x	DSV	D	10	20	X	X	.
39	„Gordo“	Lm	2x	Zelder	NL	10	19	X	X	.
40	„Gordo“	Lm	2x	Zelder	NL	10	20	X	X	.
41	411a	Lm	2x	DSV	D	10	16	X	X	.
42	„Gordo“	Lm	2x	Zelder	NL	10	19	X	X	.
43	40400	Lm	2x	DSV	D	10	20	X	X	.
45	„Gordo“	Lm	2x	Zelder	NL	10	20	19	X	.	.
48	„Fastyl“	Lm	2x	RAGT	F	10	15	.	.	.
49	„Fastyl“	Lm	2x	RAGT	F	10	20	.	X	.
50	„Gordo“	Lm	2x	Zelder	NL	10	19	X	X	.
53	„Cavour“	Lm	2x	Carneau	F	10	18	X	X	.
54	„Total“	Lm	2x	Cebeco	NL	10	17	X	X	.
55	„Trajan“	Lm	2x	RvP	B	10	19	X	.	.
56	„Total“	Lm	2x	Cebeco	NL	10	20	.	.	.
58	„Jericho“	Lm	2x	Jouffray	F	10	19	X	.	.
59	403a	Lm	2x	DSV	D	10	19	.	X	.
61	„Gordo“	Lm	2x	Zelder	NL	10	19	X	.	.
62	403a	Lm	2x	DSV	D	10	15	.	X	.
63	„Gordo“	Lm	2x	Zelder	NL	10	16	X	X	.
64	„Gordo“	Lm	2x	Zelder	NL	10	18	X	.	.
65	50404	Lm	2x	DSV	D	10	20	.	X	X

Tab. 2: Forts.

Inzuchtlinien														Topcross	
Na- me	Abstam- mung	Art	Ploi- die	Züchter	Her- kunft	Isoen- zym	AF LP	STS	G ssr	E ssr	Rost	Phäno- typ	TH ¹	EP	P
67	50107	Lm	2x	DSV	D	10	19	X	.	.
68	50107	Lm	2x	DSV	D	10	18	X	X	X
69	„Fastyl“	Lm	2x	RAGT	F	10	9	X	.	.
70	„Jericho“	Lm	2x	Jouffray	F	10	8	.	X	.
71	50107	Lm	2x	DSV	D	10	16	X	X	.
72	50107	Lm	2x	DSV	D	10	14	X	.	.
73	„Jericho“	Lm	2x	Jouffray	F	10	13	.	.	.
76	„Fastyl“	Lm	2x	RAGT	F	10	12	.	.	.
	„Avance“	Lw	4x	DLF	DK	.	16	.	19
	„Baltimore“	Lm	2x	DLF	DK	.	16	.	19
	„Dasas“	Lm	2x	DLF	DK	.	16	.	19
	„Fastyl“	Lm	2x	RAGT	F	.	16	.	19
	„Rustyl“	Lm	2x	RAGT	F	.	16	.	19

¹TH: von Inzuchtlinien wurde in Thüle Topcross-Saatgut geerntet; Lm – *L. multiflorum*, Lp – *L. perenne*, Lw – *L. multiflorum* ssp. *westerwoldicum*; EP – 10 Topcross Nachkommen wurden in Hohenthurm phänotypisch charakterisiert; P – Parzellenprüfung (= Leistungsprüfung) der Topcross-Nachkommen in Thüle; X Daten wurden erfasst; . keine Daten wurden erfasst; () Anzahl der Pflanzen, die mit AFLPs und Mikrosatelliten charakterisiert wurden (Spalten Rost und Phänotyp)

3.1.3 Topcross-Nachkommen

19 Einzelpflanzen von 163 Topcross-Nachkommenschaften (Bestäuber waren „Fastyl“ und/ oder „Gordo“) der Inzuchtlinien von 1998 (in dieser Arbeit nicht näher untersucht) wurden im Herbst 1999 in Hohenthurm ins Feld gepflanzt und phänotypisch (Tab. 6, S. 29) charakterisiert. In Thüle wurden die Parzellenprüfungen gedrillt mit „Ligrande“ als Standard. Im Jahr 2000 erfolgte in Hohenthurm und Thüle die phänotypische Merkmalerfassung. Die Anzahl der Topcross-Nachkommenschaften je Abstammung der 98-Inzuchtlinien ist in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Abstammungen und Anzahl von Inzuchtlinien und Topcross-Nachkommenschaften

Abstammung	Anzahl der Inzuchtlinien und ihrer Topcross-Nachkommenschaften
„Fastyl“	13
„Rustyl“	11
„Fortyl“	18
„Vertyl“	2
„Meribel“	4
„Bellem“	2
„Baltimore“	4
„Orlando“	8
„Ligrande“	42
Ökotyp Müller Aulendorf	31
Stamm P4	1
„Activ“	7
„Axis“	15
Li9025	5
Li9125	7

Die 99-er Inzuchtlinien standen in Thüle in einer Topcross-Anlage mit den Bestäubern „Fastyl“ oder „Ligrande“. Von diesen Inzuchtlinien wurde Topcross-Saatgut geerntet. 10

Einzelpflanzen wurden angezogen, im Oktober ins Feld gepflanzt (Einzelpflanzenabstand: 50 x 50 cm) und 2001 phänotypisch (Tab. 6, S. 29) charakterisiert. In Thüle wurden die Parzellenprüfungen im März 2001 (10,5 m² je Parzelle) in einer Wiederholung an einem Ort angelegt und im Jahr 2002 bewertet. Topcross-Saatgut konnte von 44 der 49 Inzuchtlinien aus 1999 für Einzelpflanzenprüfungen in Hohenthurm angezogen werden (Tab. 2, Topcross - EP). Ausreichend Saatgut für Parzellenprüfungen (Aussaatsmenge: 300 Körner/qm) war nur von 5 Topcrossen vorhanden (Tab. 2, Topcross - P).

3.1.4 Kreuzungen

Einzelpflanzen der in Tab. 2 aufgeführten Inzuchtlinien des Welschen Weidelgrases wurden für Kreuzungen verwendet. In Tab. 4 sind die bearbeiteten Kreuzungen einschließlich ihrer Eltern (Inzuchtlinie / Einzelpflanze) mit den Abstammungen, denen die Eltern angehörten, aufgeführt. In den Spalten Isoenzym, Hohenthurm und Thüle ist die Anzahl der untersuchten Einzelpflanzen angegeben. Ein X in der Spalte Leistungsprüfung besagt, dass die Kreuzungen auch in Parzellen geprüft wurden. Ein X in der Spalte Klonsynthetik weist darauf hin, aus welchen Kreuzungen ein Genotyp verklont und mit weiteren Klonen in einer kleinen Roggenkabine gemeinsam abblühte. In der Spalte Synthetikzusammenstellung stehen bei den Kreuzungen die Bezeichnungen von Synthetiks, in die sie eingeflossen bzw. welche Kreuzungen zusammen abgeblüht sind.

Die Auswahl der Eltern für eine Kreuzung orientierte sich am Entwicklungsstadium der Ähren und am allgemeinen Gesundheitszustand der Pflanzen. Fünf Ähren je Kreuzungselter wurden abgeschnitten. Diese blühten und reiften unter Zellglastüten bei 20-25°C für 3 bis 4 Wochen ab, wurden anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und Mitte Juli in Thüle ausgelegt. Im August wurden die Kreuzungsnachkommen pikiert, vorausgesetzt, dass genügend Nachkommen je Kreuzung (60 Pflanzen) vorhanden waren, d.h. von jeder Kreuzung wurden 40 Einzelpflanzen für die Saatgutvermehrung in kleinen Roggenkabinen, 10 Einzelpflanzen für die Charakterisierung mit Merkmalen und das Durchführen von Selbstungen in Hohenthurm (Einzelpflanzenabstand: 50 x 50 cm) und 10 Einzelpflanzen für isoenzymatische Untersuchungen im Winter benötigt. Insgesamt ergaben sich 112 Kreuzungen (2 - 152 in Tab. 4). Sie wurden im Oktober 2000 in Thüle zur Zwischenvermehrung in kleine Roggenkabinen gepflanzt (30 x 30 cm). Jeweils die ersten 10 Einzelpflanzen, die am Rand standen, wurden phänotypisch charakterisiert. Im Juli 2001 wurde das Saatgut geerntet und im Herbst für die Parzellenprüfungen in Thüle gedrillt. Die

Prüfung erfolgte im Jahr 2002. Als Vergleichsorten fungierten die Sorten ‚Ligrande‘ und ‚Lemtal‘.

Im Jahr 2001 wurden erneut Kreuzungen erstellt (OK1 - OK6 in Tab. 4). Dieses Mal wurden verklonte Kreuzungspflanzen des Vorjahres, die überdurchschnittlich in den Merkmalen Wuchshöhe und Umfang abgeschnitten hatten und unterschiedlichen Abstammungen angehörten, als ganze Pflanzen kurz vor Blühbeginn aus dem Versuchsfeld entnommen. Diese Pflanzen wurden paarweise eingetütet und ins Gewächshaus gepflanzt. Nach Abreife der Ähren wurden diese in Thüle ausgelegt, pikiert und in kleine Roggenkabinen zur Zwischenvermehrung gepflanzt. Mit dem dort geernteten Saatgut wurden Parzellenprüfungen im Herbst 2002 in Thüle/D und Serexpro/F mit Vergleichssorten (‚Ligrande‘ (D) bzw. ‚Fastyl‘ (F)) gedreht.

Tab. 4: Darstellung der verklonten Kreuzungseltern und der mit ihnen durchgeführten Kreuzungen der Jahre 2000 (2-152) und 2001 (OK1-OK6)

Kreuzung	Abstammung der Eltern	Kreuzungseltern	Erstellungsjahr	Isoenzym	Hohenturm	Thüle	Leistungsprüfung	Klonsynthetik	Synthetik
2	403a*50107	4/9;72/6	2000	6	10	10	X	.	.
6	50404*411a	17/6;41/1	2000	6	10	10	X	.	.
7	50404*41215	17/11;221/1	2000	6	10	10	X	.	Syn2,6,7
10	‚Fastyl‘*, ‚Meribel‘	66/4;30/5	2000	6	10	10	X	.	.
11	‚Fastyl‘*41215	25/7;33/9	2000	6	10
17	‚Trajan‘*50107	55/12;67/15	2000	6	10	10	X	X	Syn6
20	41215*50107	221/2;71/13	2000	6	10	10	X	.	Syn6, 7
21	‚Gordo‘*41214	39/6;32/17	2000	6	10	10	X	.	Syn3, 5
25	‚Cavour‘*50107	11/10;71/4	2000	6	10	10	.	.	Syn1, 7
26	‚Cavour‘*40400	11/13;10/7	2000	6	10	10	X	.	Syn1
27	‚Total‘*50404	54/8;17/4	2000	6	10
30	403a*, ‚Gordo‘	62/3;45/14	2000	6	10	10	X	.	Syn5
35	41215*, ‚Trajan‘	33/8;29/9	2000	6	10	10	X	.	Syn6
36	40400*, ‚Cavour‘	10/11;11/10	2000	6	10	10	X	.	Syn2
37	50404*40400	17/2;43/15	2000	6	10	10	X	X	Syn4
38	50107*40400	16/12;43/15	2000	6	10	10	X	.	Syn1
40	‚Fastyl‘*, ‚Gordo‘	25/16;20/19	2000	6	10	10	.	.	.
41	‚Fastyl‘*, ‚Jericho‘	1063/2;70/1	2000	6	10	10	X	.	.
42	‚Cavour‘*403a	11/15;22/1	2000	6	10	10	X	.	Syn1, 7
43	40400*, ‚Fastyl‘	286/1;48/1	2000	6	10
46	41813*, ‚Fastyl‘	14/2;49/4	2000	6	10	10	.	.	.
47	411a*, ‚Fastyl‘	41/10;25/14	2000	6	10	10	X	.	.
48	411a*, ‚Cavour‘	41/3;1073/7	2000	6	10
49	‚Total‘*411a	54/14;41/3	2000	6	10	10	X	.	.
53	41813*411a	14/3;41/4	2000	6	10
54	41215*411a	221/3;41/8	2000	6	10	10	X	.	.
55	41215*41214	221/3;32/10	2000	6	10	10	X	.	Syn6
56	41214*, ‚Meribel‘	32/10;30/10	2000	6	10	10	X	.	Syn3, 5
57	‚Gordo‘*, ‚Trajan‘	39/6;55/10	2000	6	10
60	‚Jericho‘*41214	70/7;32/17	2000	6	10	10	X	.	.
61	403a*41214	4/7;32/16	2000	6	10	10	X	.	Syn5
62	‚Meribel‘*403a	35/18;65/15	2000	6	10	10	X	.	Syn5
65	403a*403a	59/4;634/6	2000	6	10	10	X	.	.
66	‚Meribel‘*, ‚Cavour‘	30/10;11/2	2000	6	10	10	X	.	.
70	403a*, ‚Meribel‘	59/4;30/10	2000	6	10

Tab. 4: Forts.

Kreuzung	Abstammung der Eltern	Kreuzungseltern	Erstellungsjahr	Isoenzym	Hohenturm	Thüle	Leistungsprüfung	Klonsynthetik	Synthetik
71	„Gordo“*,Meribel’	39/7;30/4	2000	6	10	10	X	.	Syn3, 5
72	50107*,Meribel’	68/5;30/6	2000	6	10	10	X	.	Syn3
73	„Trajan“*,Meribel’	55/12;30/12	2000	6	10	10	X	X	.
74	„Trajan“*,Cavour’	55/12;11/13	2000	6	10	10	X	.	.
76	50404*403a	65/18;59/11	2000	6	10	10	X	.	Syn4, 7
77	„Total“*403a	54/12;59/4	2000	6	10	10	.	.	.
78	50107*,Gordo’	39/5;68/5	2000	6	10	10	X	.	Syn3
79	50107*403a	68/5;59/4	2000	6	10	10	X	.	Syn1, 7
80	41214*50107	32/7;68/5	2000	6	10	10	.	.	Syn3, 6
81	50107*50404	68/5;65/14	2000	6	10	10	.	.	Syn6, 7
82	41813*50107	14/11;68/5	2000	6	10	10	X	.	.
83	„Jericho“*50107	58/3;68/5	2000	6	10	10	X	.	.
84	41215*,Gordo’	37/9;50/17	2000	6	10	10	X	X	.
85	41813*,Gordo’	14/11;50/8	2000	6	10	10	X	.	.
88	41813*,Cavour’	14/13;11/18	2000	6	10	10	X	.	.
89	„Cavour“*41215*	11/8;31/13	2000	6	10	.	.	.	Syn7
90	50404*,Cavour’	17/1;11/2	2000	6	10	10	X	.	Syn7
91	50404*,Jericho’	17/17;70/3	2000	6	10	10	X	.	Syn4
92	50404*41214	17/16;32/3	2000	6	10	10	X	.	Syn2, 6
98	„Jericho“*41215*	58/3;31/18	2000	6	10	10	X	.	.
99	40400*41215	1304/15;37/5	2000	6	10	10	X	.	.
100	403a*41215	59/8;37/8	2000	6	10	10	X	.	Syn7
102	403a*„Jericho“’	59/10;58/15	2000	6	10	10	X	.	Syn4
103	40400*403a	34/7;59/10	2000	6	10	10	X	.	Syn1, 4
104	„Gordo“*40400	39/6;1304/6	2000	6	10	10	X	.	.
105	40400*,Jericho’	34/12;58/3	2000	6	10	10	X	.	Syn4
107	41813*40400	14/11;34/12	2000	6	10	10	.	.	.
108	„Trajan“*40400	55/12;286/13	2000	6	10	10	X	.	.
110	„Trajan“*50404	55/6;17/1	2000	6	10	10	X	.	Syn2, 6
111	41813*50404	14/3;17/16	2000	6	10	10	X	.	.
113	41214*41813	32/14;14/4	2000	6	10	10	X	.	Syn2
114	41214*,Trajan’	32/14;55/10	2000	6	10	10	.	.	Syn2, 6
118	„Silor“*,Fastyl’	9/17;49/18	2000	6	10	10	.	.	.
119	„Trajan“*,„Jericho“’	55/16;73/7	2000	6	10	10	.	.	.
121	„Silor“*50107	9/17;68/14	2000	6	10	10	X	.	.
122	„Trajan“*41813	55/16;14/2	2000	6	10	10	.	.	.
123	„Trajan“*411a	55/4;41/7	2000	6	10	10	X	.	.
125	„Jericho“*,Meribel’	58/7;35/9	2000	6	10	10	X	.	.
126	„Jericho“*,Gordo’	58/13;50/8	2000	6	10	10	X	.	.
128	„Jericho“*,Total’	58/13;54/11	2000	6	10	10	X	.	.
129	40400*411a	398/9;28/2	2000	6	10	10	X	.	.
130	„Silor“*,Meribel’	9/18;30/1	2000	6	10	10	X	.	.
131	„Silor“*,Cavour’	9/18;53/7	2000	6	10	10	X	.	.
135	41813*,Silor’	14/14;9/7	2000	6	10	10	.	.	.
138	50404*,Jericho’	65/6;58/7	2000	6	10	10	X	.	.
146	403a*,Silor’	59/10;9/2	2000	6	10	10	X	.	.
150	„Jericho“*50404	58/7;17/17	2000	6	10	10	X	.	.
151	„Fastyl“*,„Jericho“’	1304/17;58/7	2000	6	10	10	X	.	.
152	„Fastyl“*,„Jericho“’	76/7;8/13	2000	6	10	10	X	.	.
OK1	50107*50404	71/11;17/17	2001	.	.	.	X	.	.
OK2	„Fastyl“*50404	76/1;17/17	2001	.	.	.	X	.	.
OK3	41214*50404	32/17;17/16	2001	.	.	.	X	.	.
OK4	50107*,„Fastyl“’	68/5;25/7	2001	.	.	.	X	.	.
OK5	411a*,„Fastyl“’	41/8;76/7	2001	.	.	.	X	.	.
OK6	„Jericho“*50107	58/7;71/6	2001	.	.	.	X	.	.

Von jeder Kreuzung wurde eine Einzelpflanze für isoenzymatische Untersuchungen geselbstet: 10 Ähren je Einzelpflanze wurden abgeschnitten. Diese sollten bei 30°C unter Zellglastüten abblühen. Unkontrollierbare Klimabedingungen im Gewächshaus führten zu erheblich höheren Temperaturen, so dass Pollen und Narben verbrannten. Der Aufgang der ausgelegten Ähren lag bei max. 5 Einzelpflanzen/Selbstung. Dieser Umfang war für die Ermittlung von isoenzymatischen Spaltungsverhältnissen zu gering, so dass diese Pflanzen verworfen wurden.

3.1.5 Synthetische Sorten (Synthetiks)

Die Zusammenstellung der synthetischen Sorten (fünf gute und zwei schlechte Synthetiks aus jeweils sechs Linien unterschiedlicher Abstammungen) mit Inzuchtlinien aus 1998 sollten in Thüle erfolgen. Aufgrund ungünstiger Witterung wurde die Zusammenstellung erst im dritten Aufwuchs in Thüle des Jahres 2000 durchgeführt. Der Aufgang war zu gering, d.h. weniger als 40 Einzelpflanzen, so dass diese Synthetiks verworfen werden mußten.

Im Juli 2001 (zweiter Aufwuchs) wurden erneut sieben Synthetiks (fünf Synthetiks mit vier Komponenten und zwei mit fünf Komponenten), dieses Mal mit Kreuzungsnachkommen in Hohenthurm, zusammengestellt (siehe Tab. 4), die gemeinsam abblühten. Die Voraussetzung für die Auswahl der Kreuzungen war das Vorhandensein von 10 Pflanzen je Kreuzung, von denen jeweils eine Ähre für die Zusammenstellung der Synthetiks abgenommen wurde, und der gleiche Entwicklungszustand der Ähren. Außerdem sollten möglichst viele Abstammungen, aus denen die Kreuzungen entstanden waren, in die Synthetiks einfließen, um Inzucht zu vermeiden. Die Syn-1 wurde in Thüle in kleine Roggenkabinen zur Zwischenvermehrung gepflanzt und mit dem Syn-2 Saatgut die Parzellenprüfungen angelegt.

Im Sommer 2001 wurden je ein Genotyp aus den vier Kreuzungen 17, 37, 73 und 84 (insgesamt sieben Komponenten) aufgrund ihrer Isoenzymergebnisse (*Pgi2*- und *Acp2*-Loci einheitlich heterozygot, wobei Eltern unterschiedlich homozygot gewesen waren) ausgewählt und verklont (Tab. 4 - ‚Klonsynthetik‘). Diese verklonten vier Pflanzen blühten im Jahr 2002 (zeitgleich wie die anderen Synthetiks) gemeinsam in kleinen Roggenkabinen ab. Das in dieser Kabine geerntete Syn-1 Saatgut wurde für die Parzellenprüfungen im Jahr 2003 verwendet. Als Vergleichssorten der Parzellen dienten in Thüle/D die Sorte ‚Ligrande‘ und in Serexpro/F ‚Fastyl‘.

Fünf Synthetiks aus jeweils sechs Kreuzungsnachkommen (entspricht vier Komponenten, Gruppen in Tab. 5) und zwei Synthetiks aus jeweils 10 Kreuzungsnachkommen (entspricht fünf Komponenten) wurden in der Generation Syn-2 und ein weiterer Synthetik aus 7

Komponenten gleichzeitig in der Syn-1 in Parzellen an den zwei Orten Thüle/D und Serexpro/F geprüft. Die Zusammensetzung der Synthetiks ist in Tab. 4, Spalte ‚Synthetik‘ zu finden. Die Gruppen der Synthetiks unterschieden sich in der Anzahl der Komponenten und in den Syn-Generationen (Syn-1 oder Syn-2) und Kreuzungen der Jahre 2002 und 2003. In Tab. 5 sind die Synthetiks und Unterschiede zwischen ihnen tabellarisch zusammengefasst. Die zwischenvermehrten Ähren- und Ganzpflanzenkreuzungen (beides in Tab. 4) stellten 2-Komponenten Synthetiks dar.

Tab. 5: Übersicht über die erstellten Synthetiks

Gruppe	Anzahl der Komponenten	Syn-Generation	Art des gemeinsamen Abblühens	Beobachtungsjahr	Anzahl Synthetiks	Bezeichnung in Tab. 4
1	4	2	Ährenkreuzung	2003	5	Syn1 – Syn5
2	5	2	Ährenkreuzung	2003	2	Syn6, Syn7
3	2	2	Ganzpflanzenkreuzung	2003	6	Leistungsprüfung
4	7	1	Klonkreuzung	2003	1	Klonsynthetik
5	2	2	Ährenkreuzung	2002	64	Leistungsprüfung

3.1.6 Material für molekulare Analysen

Sechs Inzuchtlinien des Deutschen Weidelgrases (S5, S8, S10, S12, S16 und S26 - jeweils 11 Einzelpflanzen einschließlich Eltern), eine Kartierungspopulation des Deutschen Weidelgrases (S45 - 95 Einzelpflanzen zuzüglich Elter) und 12 Inzuchtlinien des Welschen Weidelgrases (30, 64, 116, 221, 286, 398, 423, 472, 634, 1063, 1073 und 1304 - jeweils acht Einzelpflanzen) wurden mit molekularen Markern charakterisiert (Tab. 2). Auf Sortenebene wurde die DNA von fünf Sorten des Welschen (Lm: ‚Baltimore‘, ‚Dasas‘, ‚Fastyl‘ und ‚Rustyl‘, Tab. 2) bzw. Westerwoldischen Weidelgrases (Lw: ‚Avance‘) mit jeweils 19 Einzelpflanzen untersucht. 84 Abstammungen (Anhang Tab. I) wurden mit jeweils 16 Einzelpflanzen (*L. perenne*, *L. multiflorum*: di- und tetraploid) untersucht, nämlich 80 di- und tetraploide Sorten und Zuchtstämme und diploide Genbankakzessionen des Welschen Weidelgrases und vier Sorten des Deutschen Weidelgrases. Eine nähere Beschreibung (Art des Materials, Ploidiestufe, Züchter bzw. Sammler des Genbankmaterials (GR-Nummern), Herkunftsland und Anzahl der untersuchten Genotypen) des untersuchten Materials ist ebenfalls im Anhang Tab. I aufgeführt.

Die 84 Abstammungen wurden nach der Verdünnung von 16 einzelnen DNAs auf einheitliche Konzentrationen zu zwei Bulks von jeweils acht Einzelpflanzen je Sorte, Zuchtstamm bzw. Akzession zusammengestellt. Die 12 Inzuchtlinien wurden mit nur einem Bulk je Linie untersucht. Zum Testen und Optimieren von Amplifikationsbedingungen (für AFLPs, genomische Weizen- und Est-abgeleitete Gersten-Mikrosatelliten, genomische und EST-

abgeleitete *Lolium*-Mikrosatelliten und Gersten-SNPs) wurden Einzelpflanzen der S5, S10, S12, S45 von *L. perenne* und Einzelpflanzen der 99-er Inzuchtlinien 35, 45, 76 und 14 verwendet. Zum Testen der *Lolium*-spezifischen Mikrosatelliten wurden zwei Haferbulks, bestehend aus jeweils 12 bespelzten bzw. unbespelzten Einzelpflanzen unterschiedlicher Abstammungen, und ein Gersten-Bulk, bestehend aus 4 Einzelpflanzen der Sorte ‚Barke‘, verwendet.

3.2 Beschreibung der phänotypischen Merkmale

Im folgenden (Tab. 6) sind die phänotypischen Merkmale mit Definition aufgeführt, die zur Beschreibung von Inzuchtlinien, Topcross-Nachkommen, Kreuzungen und fünf Sorten (Tab. 2 und Tab. 4) verwendet wurden.

Tab. 6: Erfassung phänotypischer Merkmale am untersuchten Material

Merkmal	Definition	I HT	I TH	Klon	Kreuz	TC 2000	TC 1999	Syn	I S
Bestockung	Einschätzung der Anzahl vorhandener Triebe aus denen Klone gewonnen werden können (1 = sehr wenige Klone, 9 = sehr viele Klone)	E	E	E	E	E	E	.	E
Umfang	Etwa 8 cm oberhalb des Vegetationskegels wurde ein Bandmaß um die Pflanze gelegt und der Wert (cm) abgelesen	E	E	E	E	E	E	.	E
Wuchsform	Einschätzung der Abgangswinkel der Triebe von einer gedachten Senkrechten (1 = liegend, 9 = senkrecht)	E	E	E	E	E	E	.	E
Wuchshöhe	Die Höhe (cm) der Einzelpflanzen wurde mit Hilfe eines Zollstockes vom Boden bis zur mittleren Ährenlänge der Pflanze gemessen	E	E	E	E	E	E	.	E
Fahnenblattlänge	Das Fahnenblatt wurde von der Spitze bis zum Ansatz am Halm gemessen (cm)	E	.	E	E	.	.	.	E
Fahnenblattbreite	Die breiteste Stelle des Fahnenblattes wurde gemessen (cm)	E	.	E	E	.	.	.	E
Ährenlänge	Die Länge der Ähre von der Spitze bis zum Ansatz am Halm wurde gemessen (cm)	E	.	E	E	E	E	.	E
Stand nach Winter	Beurteilung des allgemeinen Entwicklungszustandes einer Linie zu Vegetationsbeginn (1 = sehr schlecht, 9 = sehr gut)	L	.	.	L	L	L	.	.
Einheitlichkeit	Bewertung der Einheitlichkeit einer Linie (9 = homogen, 1 = nicht homogen); 05 = Merkmal im Mai erfasst	L	.	.	L	L	L	.	.
Blattfarbe	Visuelle Beurteilung der Blattfarbe (1 – hellgrün, 9 – dunkelgrün)	E
Blühtermin	Erfassung des Tages, an dem 50% der Ähren einer Linie bzw. eines Klons voll entwickelt sind und blühen	E	.	L	L
Rostbefall	Einschätzung des Rostbefalls: 0 = keine Sporulation, 4 = sehr starke Sporulation; s. Lellbach und Wehling (2000)	L	.	L	L

Tab. 6: Forts.

Merkmal	Definition	I HT	I TH	Klon	Kreuz	TC 2000	TC 1999	Syn	I S
Mehltaubefall	Einschätzung des Mehлтаubefalls (1 = kein Befall, 9 = sehr starker Befall)	L	.	.	L
Saatgutmenge	Das in den kleinen Roggenkabinen geerntete und gereinigte Saatgut wurde gewogen (g)	.	.	.	L
TKG	Tausendkorngewicht; 250 Körner mit Zählmaschine (Contador „E“ Fa. Pfeufer) abgezählt und gewogen (g)	.	L	.	L
1. Schnitt	Mit dem Parzellenmäher wurde der 1. Schnitt (Mai) von jeder Parzelle geerntet und gewogen	.	.	.	L	L	L	L	.
Trockenmasse	Differenz zwischen Ein- und Auswaage: 100 g Frischmasse vom 1. Schnitt wurden eingewogen, 48 h getrocknet und erneut gewogen	.	.	.	L	L	L	L	.
alle Schnitte	Von allen (5) in einer Vegetationsperiode durchgeführten Schnitten wurden die gewogene Frischmasse aufsummiert	.	.	.	L	L	L	L	.

I HT – Inzuchtlinien Hohenthurm, I TH – Inzuchtlinien Thüle, Kreuz – Kreuzungen, TC 2000 – Topcross-Nachkommen 2000, TC 2001 – Topcross-Nachkommen 2001, Syn – Synthetiks, I S – ausgewählte Inzuchtlinien und fünf Sorten, die molekular beschrieben wurden, E – Merkmal einzelpflanzenweise erfasst, L – Merkmal linienweise erfasst

3.3 Rosttest

Die Rosttests wurden zusammen mit Dr. H. Lellbach an der BAZ Groß Lüsewitz durchgeführt.

Für den Blattstückentest wurden 3-4 cm lange Blattstücke mit ihrer Unterseite auf 30 ppm Benzimidazol-haltigem Agar ausgelegt, mit Uredosporen eines Kronenrosterregergemisches inokuliert, 24 h im Dunkeln, dann bei Licht aufgestellt und nach 12 Tagen visuell bonitiert (Lellbach und Wehling 2000). Auf jeder Agarplatte befanden sich 72 Proben und acht anfällige Standards der Sorte ‚Aurora‘. Die Tests wurden mit Inzuchtlinien des Welschen und des Deutschen Weidelgrases durchgeführt. In Tab. 2 ist aufgeführt, welche Inzuchtlinien in welchem Umfang geprüft wurden. Besonders zu erwähnen ist die S45 von Deutschem Weidelgras. Hier wurden zunächst 30, später aber noch einmal 84 Klone untersucht. S45 ist eine Kartierungspopulation, die auch mit molekularen Markern charakterisiert wurde und auf ihr Verhalten gegenüber Kronenrost im Blattstückentest untersucht wurde, um einen möglichen Zusammenhang zwischen vorhandenen/fehlenden Banden und anfällig/resistenten Pflanzen aufzufinden.

3.4 Isoenzymatische Untersuchungen

Isoenzymatische Untersuchungen wurden auf der Versuchsstation Thüle (DSV) und am Institut für Acker- und Pflanzenbau, Saatgutwirtschaft (Frau Dr. K. Förster) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Gerätschaften und Hilfsmittel, die einen hohen Probendurchsatz ermöglichten, wurden vom Institut für Angewandte Genetik (PD Dr. E. Esch), Universität Hannover zur Verfügung gestellt.

Der Blattsaft von Einzelpflanzen der 99-er Inzuchtlinien und Kreuzungen wurden mit den Isoenzymssystemen Phosphoglucoisomerase (Pgi), Saure Phosphatase (Acp) und Glutamat-Oxaloacetat-Transaminase (Got) auf Fremdallele untersucht. Die Auftrennung der Allele erfolgte auf 12%-igen Stärkegelelen mit modifizierten Protokollen nach Eickmeyer (1994).

3.4.1 Isoenzymanalysen an Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne*)

Von Dr. U. Feuerstein (DSV Asendorf) wurden 10 Inzuchtlinien des Deutschen Weidelgrases zur Verfügung gestellt, die durch Selbstung charakteristischer Einzelpflanzen zugelassener Sorten hergestellt worden waren. Mit Pgi und Acp wurden die Blätter von Eltern und von jeweils 10 Nachkommen auf Reinheit geprüft. Sieben von diesen 10 Inzuchtlinien sind in Tab. 2 (S5 – S45) dargestellt. Drei Linien wurden auf Grund von fremden Allelen als sogenannte unreine Linien verworfen und sind dort nicht aufgeführt.

3.4.2 Isoenzymanalysen an Welschem Weidelgras (*Lolium multiflorum*)

Von den 99-er Inzuchtlinien (Nummern zwischen 30 bis 1304 und 2 bis 76, Tab. 2) wurden jeweils die Blätter von 10 Einzelpflanzen getestet und Inzuchtlinien, die fremde Allele aufwiesen, verworfen. Ebenso nicht weiter berücksichtigt wurden Kreuzungen mit fremden Allelen, die nicht in den Eltern gefunden wurden. Zeigten die Kreuzungsnachkommen fremde Allele bei reinen Inzuchteltern (33, 39, 44, 45, 58, 97, 101, 132, 133, 134, 136, 137, 141, 148) oder war der Pflanzenaufgang der Kreuzungsnachkommen zu gering (weniger als 60 Pflanzen), wurden die Kreuzungen verworfen. Ihre ingezüchteten Eltern aber wurden als Klone an drei Orten weiter mitgeprüft. Bei den Kreuzungen wurden jeweils sechs Nachkommen und ihre Eltern (mit Wiederholung) auf fremde Allele untersucht.

3.5 DNA-Analysen

Die molekularen Untersuchungen und die Entwicklung von Markern erfolgten am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben im Labor von Dr. K. J. Dehmer, AG Molekulare Marker der Abteilung Genbank (Leitung von Prof. Dr. A. Graner). Für die molekularen Analysen wurden etwa 100 mg Blattmaterial je Einzelpflanze geerntet, in flüssigem Stickstoff mit einer MM300-Mühle (Retsch/ Haan/D) gemahlen, DNA nach Doyle und Doyle (1990) mit kleinen Modifikationen extrahiert und auf 20 ng/μl verdünnt.

3.5.1 AFLP (amplified fragment length polymorphism)

Zunächst wurden zwei AFLP-Protokolle verglichen (Bert et al. 1999 und Dehmer 2001). Anstatt des von Bert et al. (1999) verwendeten Vier-Basen-Schneiders (4-cutter) *TruI* wurde das Isoschizomer *MseI* verwendet. In beiden Protokollen kam als Sechs-Basen-Schneider (6-cutter) das Restriktionsenzym *EcoRI* zum Einsatz. Die 17 Primerkombinationen von Bert et al. (1999) wurden zum Testen verwendet. Da das Protokoll von Dehmer (2001) zu klareren Ergebnissen (Peaks) führte, diente es für die weiteren Analysen zur Orientierung. Für die eigentlichen Analysen wurde der Sechs-Basen-Schneider *PstI* anstatt *EcoRI* verwendet. Für die AFLP-Analysen wurde genomische DNA (100 ng) mit *PstI* (14 U) und *MseI* (2 U) (New England Biolabs) verdaut und anschließend mit den entsprechenden Adaptern ligiert. Die fertigen Ligations-Ansätze wurden 1:10 mit TE verdünnt und 3,7 μl davon in der Präamplifikation mit *Taq*-Polymerase, dNTPs, MgCl₂, P01-Primern und M02- bzw. M03-Primern, Reaktionspuffer und Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 μl gebracht, im Thermal Cycler (PE9700) amplifiziert und dann für die selektive Amplifikation 1:50 in TE verdünnt. Die Amplifikation erfolgte mit fluoreszenz-markierten *Pst*-Primern (FAM – blau fluoreszierend, HEX – grün fluoreszierend, NED – gelb fluoreszierend). Amplifikationsansätze mit unterschiedlicher Fluoreszenz-Markierung wurden gemischt (FAM - 1,0 μl, HEX – 3,0 μl, NED – 2,0 μl), 1:1 mit einem Ladepuffer/Formamid/Standard-Mix verdünnt und auf 6%-igen PAGEplus Gelen (36 cm) im ABI 377 (PE BioSystems, Weiterstadt/D) aufgetragen. Die Ansätze liefen für 5,5 h bei 2,875 kV. Die Auswertung erfolgte mit GeneScan 3.1, die Umformung in eine binäre Matrix mit Genotyper 2.1 (beide PE BioSystems). 250 Primerkombinationen wurden mit drei *L. multiflorum*- (30, 398 und 634) und einer *L. perenne*-DNA (S45) getestet. Primerkombinationen, mit denen reproduzierbare Ergebnisse erzielt wurden, die polymorph und von guter Qualität waren (saubere und hohe Peaks/Fragmente, die gleichmäßig zwischen 75 und 600 bp verteilt waren), wurden ausgewählt. Bei den 12 Inzucht-

linien handelte es sich um die fünf Kombinationen: P33M16, P33M70, P35M73, P40M54 und P44M75 (Codes nach Keygene, Wageningen/NL). Für die jeweils zwei Bulks der 84 Abstammungen und Genbankakzessionen (einschließlich der 12 Inzuchtlinien des Welschen Weidelgrases) waren die drei Primerkombinationen P39M16, P40M51 und P44M16 für ihre Diskriminierung ausreichend, d.h. die zwei Bulks, die derselben Abstammung angehörten, gruppierten zusammen. In der Kartierungspopulation kamen die Primerkombinationen P33M15, P33M75, P39M16, P39M61, P40M51, P44M15, P44M51, P44M59, P44M70, E33M62, E38M50, E40M50 und E41M47 zum Einsatz.

3.5.2 Genomische *Lolium*-Mikrosatelliten

Die Analysen mit genomischen Mikrosatelliten erfolgten mit modifizierten Protokollen von Kubik et al. (1999, 2001) und Jones et al. (2001) (Anhang Tab. II). Zwei Detektionssysteme wurden verglichen. Im Anhang Tab. III sind die Vorwärts- und Rückwärts-Primersequenzen der genomischen *Lolium*-Mikrosatelliten zusammen mit der Markerklasse und deren Genort aufgeführt.

Bei der Silbernitrat-Färbung wurden Mikrosatelliten-Ansätze auf 10%-igen Polyacrylamidgelen (30 cm) bei 1200 V über 2 h aufgetrennt, anschließend mit Silbernitrat gefärbt (Budowle et al. 1991), eingescannt und mit dem Programm RFLPScan V3.12 Scanalytics Software Inc. (Bullerica, MA, USA) ausgewertet.

Für die automatische Fragmentanalyse (ABI 377, PE BioSystems, Weiterstadt/D) mittels M13-verlängerten Vorwärts-Primern (Oetting et al. 1995) wurden unterschiedlich fluoreszenz-markierte Primerkombinationen (FAM, HEX, NED) zusammenpipettiert und auf 6%-igen PAGEplus Gelen (12 cm) aufgetragen. Nach 2 h bei 0,75 kV erfolgte die Auswertung der Gele, wie bei den AFLPs, mit GeneScan und Genotyper.

3.5.3 Mikrosatelliten aus Gersten-ESTs und aus Weizen

42 Mikrosatelliten-Primerkombinationen aus Gersten-ESTs (Thiel et al. 2003; die Sequenzen dieser Mikrosatellitenprimer sind noch nicht öffentlich zugänglich; Primersequenzen sind zu erfragen bei Prof. Dr. A. Graner, IPK Gatersleben.) wurden auf ihre Übertragbarkeit auf *Lolium* mit *L. perenne*-DNA (S45 bzw. S5, S10) und *L. multiflorum*-DNA (Inzuchtlinien 35, 45 bzw. 76) untersucht. Als Referenz diente die Gerstensorte ‚Barke‘. Mit dem Gersten-Protokoll wurden nur die entsprechenden Mikrosatelliten-Fragmente bei ‚Barke‘ amplifiziert, für *Lolium* mussten die Bedingungen stark verändert werden, um überhaupt Produkte zu

erhalten. Dies geschah durch das Herabsenken der Primer-Bindungstemperatur um 5°C im Vergleich zum Ausgangsprotokoll (Thiel et al. 2003) und die Zugabe von zusätzlichen 2 mM Magnesium²⁺.

23 fluoreszenz-markierte genomische Mikrosatelliten-Primerkombinationen aus Weizen (Röder et al. 1998) wurden mit ‚Chinese Spring‘ als Referenz getestet. Die Vorwärts- und Rückwärts-Primersequenzen der Weizenmikrosatelliten sind zusammen mit der Markerklasse und deren Genort im Anhang (Tab. III) aufgeführt. Die Sequenzen der geprüften Primerkombinationen Xgwm218 und Xgwm638 sind nicht publiziert (Dr. K. J. Dehmer, IPK Gatersleben, persönl. Mitteilung) und somit nicht dort aufgeführt. Für die Weizen-Mikrosatelliten mussten die Primer-Bindungstemperaturen des Ausgangsprotokolls für *Lolium* leicht verändert werden. Einige Mikrosatelliten-Primerkombinationen benötigten zusätzlich Magnesium.

3.5.4 Entwicklung von Mikrosatelliten aus EST-Sequenzen

Von der Datenbank des DKFZ Heidelberg (<http://srs.ebi.ac.uk>) wurden *Lolium*-Sequenzen im FASTA-Format herunter geladen, mit dem Programm MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>) Mikrosatelliten-Sequenzen aus der FASTA-Datei herausgefiltert und mit Hilfe des Programmes Primer3 (http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) Primer für beide flankierenden Enden der Mikrosatelliten entwickelt. Im Anhang Tab. III stehen die Vorwärts- und Rückwärts-Primersequenzen der EST-abgeleiteten *Lolium*-Mikrosatelliten zusammen mit der Markerklasse und deren Genort. Weitere Angaben über die EST-abgeleiteten Mikrosatelliten-haltigen Sequenzen sind im Anhang (Tab. X) aufgeführt. Der Umfang an publizierten kodominanten genomischen Mikrosatelliten bei *Lolium* ist gering. In öffentlichen Datenbanken wurden 650 frei zugängliche *Lolium*-EST-Sequenzen gefunden. Die Auswahlkriterien für die Anzahl von Wiederholungen eines Mikrosatelliten wurden deshalb auf drei bei Dinukleotid-Motiven gesetzt und Wiederholungseinheiten von einzelnen Basen zugelassen, ebenso unterbrochene/imperfekte Mikrosatelliten (interrupted SSRs).

Die Amplifikationsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 15 µl mit 1x Puffer (mit 1,5 mM Mg(OAc)₂), 2,0 mM Mg(OAc)₂, 0,25 U Taq Polymerase (Eppendorf, Deutschland), 2,5 nM je Primer, 20 ng genomische DNA und 150 pmol je dNTP (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) angesetzt. Die Amplifikationen erfolgten unter den folgenden touch-down Bedingungen (Absenken der Primer-Bindungstemperatur pro Zyklus) in GeneAmp Cyclern PE9700 (Perkin Elmer, Weiterstadt): 3 min bei 94°C, 10 Zyklen mit 30 sec bei 94°C, 30 sec

bei 56°C (-0.5°C/Zyklus), 30 sec bei 72°C, 35 Zyklen mit 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 49°C und 30 sec bei 72°C und einer Endelongation von 5 min bei 72°C. Die Ansätze wurden auf 1,5%-igen Agarosegelen auf ihren Amplifikationserfolg überprüft und auf 10%-igen Polyacrylamidgelen mit anschließender Silbernitrat-Färbung (Budowle et al. 1991) aufgetrennt. Die Größenbestimmung der Mikrosatelliten-Fragmente erfolgte anhand von 25 bp und 100 bp Standards (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und dem Vergleich mit den vorhergesagten Größen aus dem Programm MISA.

3.5.5 STS (sequence tagged sites) - Marker aus anderen Kulturarten

16 STS-Marker (Lallemand et al. 1998), die aus anderen kultivierten Poaceae-Arten wie Reis, Mais, Gerste und Roggen entwickelt worden sind, wurden auf Polymorphismen in der Kartierungspopulation getestet. Die Auswahl der Primer-Bindungstemperaturen der Primerpaare orientierte sich jeweils an der niedrigeren Schmelztemperatur von beiden Primern. Die Vorwärts- und Rückwärts-Primersequenzen der STS-Marker stehen ebenfalls zusammen mit der Markerklasse und deren Genort im Anhang (Tab. III).

3.5.6 SNPs (single nucleotid polymorphism) aus Gersten-ESTs in *Lolium*

Gersten-SNP spezifische Primerpaare (Kota et al. 2001) wurden an einer *L. multiflorum*-DNA (Inzuchtlinien 14, 35, 45) und zwei *L. perenne*-DNAs (S45, S10 bzw. S12) getestet. Die Amplifikationsprodukte verschiedener Pflanzen, die nach Agarosegelelektrophorese dieselbe Größe hatten, wurden ausgeschnitten und mit einem Geextraktions-Kit aufgereinigt (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die aufgereinigten Fragmente wurden hinsichtlich ihrer Konzentration im Agarosegel überprüft. Pro Sequenzierungsamplifikation wurden für jeden Ansatz (je Vorwärts- und Rückwärts-Primer pro Fragment) 5 µl des aufgereinigten Produktes (Konzentration 100 ng) benötigt. Die Sequenzierung erfolgte mit einem MegaBASETM1000 Sequence Analyser (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Die Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärts-Ansätze der einzelnen DNAs wurden mit dem Programm Sequencher Version 2.1 (Gene Codes Corporation, USA) auf Sequenzierfehler untersucht und Polymorphismen zwischen den DNAs einer Primerkombination manuell gesucht. Die aus Gersten-ESTs abgeleiteten Mikrosatelliten und SNPs wurden im Rahmen des GABI-Projekts hergestellt und sind zum Großteil noch nicht öffentlich. Sequenzen sind zu erfragen bei Prof. Dr. A. Graner, IPK Gatersleben.

3.6 Datenanalyse

Alle phänotypischen Merkmale wurden zunächst einzeln verrechnet. Für die Varianzanalysen kamen mehrere Modelle zum Einsatz. Für das Pflanzenmaterial lag eine zweifache hierarchische Klassifikation mit Pflanzen innerhalb der Linien und Linien innerhalb der Abstufungen (Abstammungen) vor. Um Unterschiede zwischen den Abstammungen zu prüfen, wurden die Linien bzw. Kreuzungen als zufällige Stichprobe aufgefasst. Die Pflanzen stellen eine zufällige Stichprobe innerhalb der Linien bzw. Kreuzungen dar. Da das Modell nicht balanciert war, lassen sich die Varianzursachen nicht völlig voneinander trennen. Die F-Tests sind daher nur approximativ. Unterschiede zwischen den Linien, Sorten bzw. Kreuzungen wurden mit gestaffelten Grenzdifferenzen durch paarweisen Vergleich mit dem Student-Newman-Keuls-Test (SNK-Test) bei Merkmalen analysiert, die an Einzelpflanzen in Einzelpflanzenbeeten erfasst worden waren. Zwischen den Merkmalen wurden Korrelationen auf der Basis der Mittelwerte der Linien, Linien- und Topcross-Nachkommen und Kreuzungen berechnet. Um festzustellen, ob einseitige Abhängigkeiten zwischen Kreuzungseltern und ihren Nachkommen bestehen, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Für Mittelwertvergleiche von zwei Gruppen, wie Topcrosse und Kreuzungen kam der t-Test zum Einsatz. Der t-Test wurde bei Assoziationsstudien von molekularen Markern mit morphologischen Merkmalen der 99-er Inzuchtlinien und der Kartierungspopulation verwendet, wobei die Gruppen für jedes Fragment neu gebildet wurden in Abhängigkeit vom Vorhandensein bzw. Fehlen eines Mikrosatelliten- oder AFLP-Fragments. Aus diesen Gruppen resultierten die Mittelwerte für die einzelnen phänotypischen Merkmale. Mit der ANOVA war eine Vorauswahl der für den t-Test sinnvoll erscheinenden Fragmente getroffen worden. Als Programmpaket kam SAS (Statistical Analyses System, Version 6.12, SAS Institute, Cary, NC, USA) zum Einsatz und zwar PROC GLM für unbalancierte Varianzanalysen und den SNK-Test, PROC ANOVA für die Erfassung molekularer Varianzen, PROC MEANS für Mittelwerte und Standardabweichungen, PROC CORR für die Korrelationskoeffizienten, PROC REG für die Regressionsanalyse, PROC TTEST für den Vergleich der zwei Gruppen, z.B. rostresistent und rostanfällig und PROC FREQ für die Häufigkeit der einzelnen Mikrosatellitenfragmente innerhalb einer Sorte.

Die genetische Ähnlichkeit wurde für die Mikrosatelliten nach Dice (1945) und für die AFLPs nach Jaccard (1908) berechnet. Für den Vergleich der AFLP-, Mikrosatelliten- und phänotypischen Daten der 12 Inzuchtlinien wurden alle drei Datensätze zunächst standardisiert, anschließend die Euclidschen Distanzen (Sneath und Sokal 1973) zwischen

allen möglichen paarweisen Kombinationen der Einzelpflanzen berechnet und diese mit dem Mantel-Test (Mantel 1967) verglichen. Die Transformation erfolgte für Inzuchtlinien und fünf Sorten in ein UPGMA (unweighted pair-group method of arithmetic averages) Phänogramm. Die mit AFLPs analysierten 84 Weidelgräser-Abstammungen wurden mit der PCA (principal component analysis) dargestellt. Für diese Analysen wurde das Programmpaket NTSYSpc 2.1 (Exeter Software, Setauket/USA) eingesetzt.

Die Selbstungsnachkommenschaft S45 (Tab. 2) wurde für die Kartierung benutzt. Hier flossen die polymorphen Marker (AFLPs, STSs, EST-abgeleitete und genomische Mikrosatelliten) ein. Die Phase der Marker war unbekannt. Mit den STS-Markern und genomischen Mikrosatelliten, bei denen die beobachteten Spaltungsverhältnisse den erwarteten Spaltungsverhältnissen für kodominante Marker von 1:2:1 entsprachen, wurden bei einem LOD-Grenzwert von 3 sieben Kopplungsgruppen mit Hilfe des Programms Joinmap Version 2.0 (Stam und van Ooijen 1995) erhalten. Die übrigen Mikrosatelliten und AFLPs wurden mit dem Programm Mapmanager QTXb17 (<http://mapmgr.roswellpark.org/mmQTX.html>) mit einem $LOD > 3$ den Kopplungsgruppen zugeordnet. Markerabstände wurden nach Kosambi (Kosambi 1944) berechnet. Die graphische Darstellung der Kopplungsgruppen erfolgte mit dem Programm MapChart Version 2.1 (Voorrips 2002).