

Swenja Tams¹, Brigitte Ruge-Wehling², Joerg Schondelmaier³, Jens Weyen³, Beate Rücker¹, Peter Wehling²

Verwendung molekularer Marker für die Überprüfung der Zuchtformel und zur Differenzierung von Hybridsorten bei Winterraps

Use of molecular markers for checking the hybrid formula and discriminating hybrid varieties in winter oilseed rape

161

Zusammenfassung

Die Eignung von Mikrosatellitenmarkern zur Sortendifferenzierung wurde anhand von 42 Raps-Hybriden und deren 54 Elternlinien geprüft. Zur Anwendung kamen 27 Mikrosatellitenmarker, die sich durch eine gute Darstellbarkeit und hinreichenden Polymorphismus auszeichneten und in zwei unabhängigen Laboren mit unterschiedlicher Methodik erfasst wurden. Die DNA-Proben repräsentierten Mischproben aus je 40 Einzelpflanzen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Überprüfung der Zuchtformel Kenntnisse zum Sortentyp und zu den Hybrideltern erfordert. Aufgrund gewisser Anteile von Restheterozygotie in den Linien konnte nicht immer vom DNA-Fragmentmuster auf den Sortentyp geschlossen werden. Die Plausibilität der Zuchtformel konnte relativ gut abgeschätzt werden, wenn die Elternlinien bekannt waren und die Ergebnisse in den Laboren übereinstimmten. Die Studie verdeutlicht, wie wichtig die Harmonisierung der Methodik zwischen verschiedenen Laboren ist, um nicht nur sehr gut übereinstimmende, sondern zweifelsfreie Ergebnisse bei der Untersuchung von Rapsmischproben mit Mikrosatellitenmarkern zu erhalten.

Stichwörter: Sortenunterscheidung, Winterraps, Hybridsorten, molekulare Marker

Abstract

Microsatellite markers were investigated with regard to their suitability to discriminate hybrid varieties of winter oilseed rape. To this end, 42 hybrids and their 54 parent lines were analysed with 27 microsatellite markers, the latter of which had been selected for good readability as well as polymorphism and were assessed by two independent laboratories using differing molecular-marker methodology. The DNA samples represented mixtures of 40 individual plants (per entry). The results demonstrate that in addition to the DNA marker patterns, knowledge of the variety type as well as of the hybrid parents is required as a prerequisite to check the hybrid formula for a given DNA sample. In some instances, heterogeneity or residual heterozygosity of parent lines at the SSR-marker level obscured inference of the variety type. Plausibility of the hybrid formula could be checked quite readily in cases where the parental lines were known and results were consistent among the two labs. The study demonstrates that detailed harmonization of methods between different laboratories is indispensable to obtain results which not only are consistent among labs but also unequivocal when assessing composite samples of oilseed rape via molecular markers.

Key words: Variety discrimination, winter oilseed rape, hybrid varieties, molecular markers

Institut

Bundessortenamt, Hannover¹

Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, Quedlinburg²

Saaten-Union Resistenzlabor GmbH, Leopoldshöhe³

Kontaktanschrift

Dr. Beate Rücker, Bundessortenamt, Osterfelddamm 80, 30627 Hannover, Germany,

E-Mail: beate.ruecker@bundessortenamt.de

Zur Veröffentlichung angenommen

Oktober 2008

Einleitung

Seit mehreren Jahren wird der potentielle Einsatz von molekularen Markern in der Sortenprüfung intensiv diskutiert, und es gibt international zahlreiche Forschungsaktivitäten zu diesem Thema. Von besonderem Interesse sind molekulare Markertechniken auch bei Winterraps, wobei es insbesondere um die Entwicklung neuer Verfahren für das Management der Referenzkollektion geht.

Die vorliegende Untersuchung hatte das Ziel, Möglichkeiten zur Verwendung molekularer Marker für die Überprüfung der Zuchtformel und zur Differenzierung von Hybridsorten bei Winterraps zu untersuchen. Darüber hinaus sollten durch Beteiligung von zwei Laboren Erfahrungen zur Harmonisierung der Methode gesammelt werden. Die molekularen Untersuchungen wurden im Saaten-Union Resistenzlabor GmbH (SURL) in Leopoldshöhe sowie im Institut für landwirtschaftliche Kulturen der ehemaligen Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Groß Lüsewitz (BAZ) durchgeführt. Das Bundessortenamt (BSA) stellte das erforderliche Pflanzenmaterial bereit und koordinierte die Arbeiten.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an einem vom BSA ausgewählten Sortiment aus 42 Hybriden und deren 54 Elternlinien parallel in den zwei Laboren durchgeführt. Als Detektionstechniken kamen im SURL eine kapillar-basierte Methode (System ABI 3100) und in der BAZ eine gelbasierte Methode (System LI-COR 4300) zum Einsatz.

Blattmaterial von je 2 x 40 Einzelpflanzen wurde kodiert an die Labore versandt und dort als Mischproben analysiert. Die Mischproben wurden aus gleichen Gewichtsanteilen jeweils einer Blattspitze pro Einzelpflanze zusammengestellt und dann der DNA-Extraktion unterzogen. Die PCR-Bedingungen wurden laborintern auf das jeweils verwendete Detektionssystem optimiert. Zunächst war nur für 8 kodierte Hybriden ihre Zuordnung zu den kodierten Elternlinien bekannt, um von den Laboren die DNA-Fragmentgrößen besser bestimmen zu können.

Insgesamt wurden 36 verschiedene Mikrosatellitenmarker getestet. Dabei handelte es sich um 26 frei verfügbare Marker aus der BrassicaDB von EMBL, die von NIAB (UK) und GEVES (FR) für Anwendungen in der Sortenprüfung vorselektiert waren (<http://ukcrop.net/brassica.html#brassicadb>). Diese wurden durch eine Auswahl von 10 neueren Mikrosatellitenmarkern (PIQUEMAL et al., 2005) ergänzt. Das erstgenannte Set aus 26 Mikrosatellitenmarkern wird in einem vom Gemeinschaftlichen Sortenamt geförderten Verbundprojekt zum Management der Referenzkollektion bei Winterraps verwendet, an dem Sortenprüfämter aus Großbritannien, Frankreich, Dänemark und Deutschland beteiligt sind.

Ergebnisse

Qualität der Marker und Reproduzierbarkeit der Methodik
Von den 36 in beiden Laboren anfangs getesteten Markern erwiesen sich letztlich 27 als gut auswertbar und hinreichend polymorph (Tab. 1). Die Anzahl der detektierten Signale je Marker lag in diesem Rapssortiment zwischen 1 und 6.

Eine kodominante Auswertung der DNA-Fragmentmuster war problematisch, weil unerwartet einige Elternlinien mehr als 2 Signale je Marker zeigten. Der Polymorphiegrad je Marker lag durchschnittlich bei 3 und maximal bei 6 polymorphen Signalen (Tab. 1). Die Wiederholbarkeit auf Basis von je 2 unabhängigen Mischproben (A- und B-Proben) war innerhalb der Labore sehr gut (BAZ: 100% Wiederholbarkeit; SURL: 99,3%). Die Übereinstimmung zwischen Laboren war problematischer, weil der Einfluss der unterschiedlichen Gerätesysteme und der Reagenzien die Abgleichung der DNA-Fragmentgrößenbestimmung zwischen den Laboren erschwerte.

Bei wenigen Markern konnten einzelne Signalausprägungen nur in einem der Labore bei wenigen Sorten detektiert werden, während im jeweils anderen Labor diese Ausprägungsstufen nicht auftraten. Die Intensität der Signale fiel zum Teil laborspezifisch unterschiedlich aus, so dass bei einzelnen Markern die Auswahl der auswertbaren Signale voneinander abwich, obwohl der Marker in jedem Labor einzeln betrachtet eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse lieferte.

Überprüfung der Zuchtformel

Mit Ausnahme von 8 kodierten Hybriden, deren Zuordnung zu den Elternlinien den Laboren bekannt war, um die relevanten DNA-Fragmentgrößen besser bestimmen zu können, wurden die übrigen 34 Hybriden zunächst blind untersucht. Für alle 42 Hybriden wurde ausgezählt, wie häufig die Signalausprägung (1 – vorhanden; 0 – fehlend, Tab. 2) in der Hybride nicht den Erwartungen aufgrund der Ausprägung in den Elternlinien entsprach. Dann wurden die von der Erwartung abweichenden Signale durch die Labore überprüft, wobei die Zuordnung der Eltern bekannt gegeben wurde.

Bei bekannter Zuchtformel waren die Fragmentmuster deutlich zuverlässiger ansprechbar sowohl in Bezug auf die Fragmentgröße als auch hinsichtlich der Intensitätsgrenze, ab welcher ein Signal als relevant angesprochen wurde. Im Vergleich zum Blindversuch (Abb. 1A) reduzierte sich bei bekannter Zuordnung der Eltern (Abb. 1B) die Anzahl jener Signalausprägungen, die sich als unerwartet herausstellten, deutlich.

Insgesamt führten die Auswertungen bei vier Hybriden zu stärkeren Abweichungen vom erwarteten Signalmuster. Bei geringfügigen Unterschieden stimmten dabei die Ergebnisse beider Labore gut überein (Tab. 3). Bei den meisten von der Erwartung abweichenden Auswertungsergebnissen handelte es sich um Abweichungen vom Typ 2 (vgl. Tab. 2); Abweichungen vom Typ 1 traten in einigen Fällen auf, während solche vom Typ 3 sehr selten waren.

Tab. 1. Qualität und Reproduzierbarkeit der Mikrosatellitenmarker in den zwei Laboren

Marker	Quelle	> 2 Signale/Genotyp		polymorphe Signale	
		BAZ	SURL	BAZ	SURL
BN12A	Brassica DB*	x	x	3	3
BN26A	Brassica DB			2	3
BRAS019	Piquemal et. al **	x	x	4	6
CB10179	Piquemal et. al			2	2
CB10204	Piquemal et. al	x		3	3
CB10234	Piquemal et. al			2	3
CB10302	Piquemal et. al	x		4	2
CB10347	Piquemal et. al	x		4	5
CB10524	Piquemal et. al	x	x	3	3
CB10587	Piquemal et. al	x		5	5
CLONE33	Brassica DB		(x)	3	4
MB5	Brassica DB			2	2
Na10-E02	Brassica DB	x	x	3	5
Na10-F06	Brassica DB			1	1
Na10-H03	Brassica DB		x	2	3
Na12-A02	Brassica DB	x	x	6	6
Na12-E02	Brassica DB		(x)	4	4
Na14-H11a	Brassica DB			2	4
Ol11-B05	Brassica DB			2	2
Ol11-G11	Brassica DB	x	x	3	3
Ol12-F02	Brassica DB	x	x	6	4
Ra1-F06	Brassica DB	x		4	2
Ra2-A05	Brassica DB	x	x	3	3
Ra2-A11	Brassica DB			2	2
Ra2-E03	Brassica DB			2	2
Ra2-E11	Brassica DB	x	x	4	4
Ra2-F11	Brassica DB			2	2
<u>nicht gut auswertbar (wg. Qualität, Polymorphiegrad)</u>					
CB10028	Piquemal et. al				
CB10320	Piquemal et. al				
Na12-D04	Brassica DB				
Na14-E08	Brassica DB				
Ol09-A06	Brassica DB				
Ol10-B01	Brassica DB				
Ol10-F11	Brassica DB				
Ol13-C12	Brassica DB				
Ra2-D04	Brassica DB				

* BrassicaDB= <http://ukcrop.net/brassica.html#brassicadb>

** PIQUEMAL et al. (2005)

Genetische Ähnlichkeiten

Die genetische Ähnlichkeit (genetic similarity, GS) zwischen allen möglichen Paaren von Versuchsgliedern wurde nach Jaccard auf Basis der BAZ- und SURL-Daten getrennt berechnet (0= absolut verschieden, 1= identisches DNA-Fragmentmuster). Ein GS-Wert von 0,97 entspricht in dieser Auswertung einer einzigen nicht übereinstimmen-

den DNA-Fragmentposition (Mismatch: Versuchsglied I= 1, Versuchsglied II= 0). GS= 0,98 entspricht einem Mismatch (1 - 0) und einem nicht auswertbaren DNA-Fragmentpaar aufgrund einer nicht auswertbaren DNA-Fragmentposition in einem der beiden Versuchsglieder.

Die Variation der GS-Werte und der Mittelwert waren in beiden Laboren jeweils nahezu übereinstimmend

Tab. 2. Denkbare Auswertungsmuster für Signalausprägungen in Hybriden und ihren Eltern

Saatelter	Hybride	Pollenelter	
1	1	1	erwartet (Kodominanz)
1	1	0	erwartet (dominante Vererbung vom Saatelter)
0	1	1	erwartet (dominante Vererbung vom Pollenelter)
0	0	0	erwartet
0	1	0	unerwartet ("Typ 1")
1	0	0	unerwartet ("Typ 2a")
0	0	1	unerwartet ("Typ 2b")
1	0	1	unerwartet ("Typ 3")

(Tab. 4). Hybriden waren untereinander ähnlicher als Linien untereinander. Ein Linienpaar war in einem der Labore nicht unterscheidbar (DNA-Fragmentmuster in der A- und B-Probe identisch; GS= 1,0). In dem anderen Labor konnte in einem Marker ein Fragmentgrößenunterschied gefunden werden. Dieser Marker zeigte über alle untersuchten Genotypen betrachtet eine unterschiedliche Anzahl polymorpher Banden in den Laboren. Ein kerngenetischer Unterschied zwischen den beiden betreffenden Linien war nicht zu erwarten, da es sich um eine sterile Linie und den Maintainer handelte. Die Ähnlichkeit zwischen Linien und Hybriden war erwartungs-

gemäß höher als zwischen Linien. Die höchste Ähnlichkeit wurde zwischen den Hybriden gefunden.

Die Unterschiede im detektierten Signalmuster zwischen den beiden Laboren resultierten in Differenzen zwischen den paarweisen GS-Werten je Labor, wobei die Differenz im Einzelfall absolut bis zu 0,19 Einheiten unabhängig von der Materialgruppe (Elterlinien vs. Hybriden) variierte. Die Häufigkeitsverteilung der absoluten Differenzen ist in Abb. 2 dargestellt. Die Korrelation der GS-Werte zwischen den Laboren wird in Abb. 3 gezeigt.

In vielen Fällen zeigten die Hybriden eine relativ hohe Ähnlichkeit zu einer der Elternlinien. Die genetische

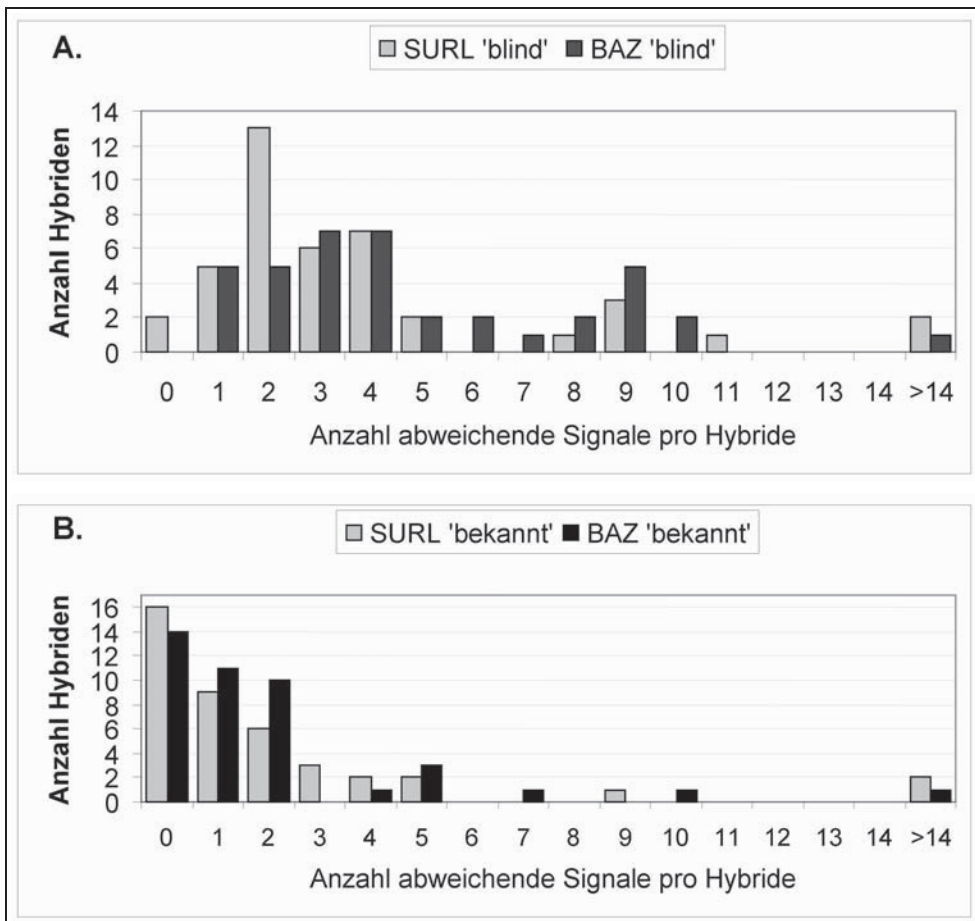


Abb. 1. Anzahl Signalausprägungen, die aufgrund der Zuchtformel nicht zu erwarten waren (basierend auf 25 ausgewerteten Markern); A.: Blindversuch; B.: mit bekannter Zuordnung der Elternlinien.

Tab. 3. Nach Bekanntgabe der Elternlinien-Zuordnung verbliebene Abweichungen vom erwarteten Signalmuster in den 42 Hybriden (Fettdruck: Hybriden mit vielen Abweichungen in beiden Laboren)

Hybride (Code)	SURL	BAZ	Hybride (Code)	SURL	BAZ
BSA_03	1	1	BSA_46	9	7
BSA_04	0	0	BSA_50	2	0
BSA_09	3	1	BSA_51	1	2
BSA_10	2	1	BSA_52	1	1
BSA_11	0	1	BSA_58	2	1
BSA_12	1	1	BSA_59	4	0
BSA_13	0	4	BSA_63	15	10
BSA_14	2	2	BSA_64	2	1
BSA_15	1	0	BSA_65	0	2
BSA_16	2	1	BSA_66	0	2
BSA_26	3	0	BSA_73		2
BSA_28	0	0	BSA_74	0	0
BSA_31	5	5	BSA_75	0	0
BSA_32	0	0	BSA_78	19	15
BSA_33	1	2	BSA_79	3	2
BSA_36	4	0	BSA_82	0	2
BSA_37	1	2	BSA_86	0	0
BSA_38	1	2	BSA_87	0	0
BSA_39	0	5	BSA_89	1	1
BSA_40	0	5	BSA_93	0	1
BSA_45	0	0	BSA_94	5	0

Ähnlichkeit ist jedoch nicht geeignet, Eltern einer Hybride ohne Kenntnis der Zuchtformel zu identifizieren.

Zur Visualisierung wurden über alle Hybridsorten (H) und Elternlinien (L) Dendrogramme mit der UPGMA-Methode erstellt (Abb. 4). Der Mantel-Z-Test ermöglicht eine Abschätzung über die Übereinstimmung der Dendrogramme auf Grundlage der beiden Labore, welche mit $r = 0,9$ als sehr gut zu beurteilen ist.

Diskussion

Bei der Auswertung der DNA-Fragmentmuster traten in den Mischproben einiger Elternlinien Marker mit mehreren Signalen auf, was die Auswertbarkeit der betreffenden Fragmentmuster beeinträchtigte. Das Auftreten multipler Signale kann mehrere Ursachen haben. Erstens kann eine gewisse Heterogenität von Linien vorliegen, die dazu führt, dass in den Mischproben mehrere Allele eines Markers auftreten. Eine weitere Ursache kann das Vorkommen homoeologer Abschnitte im A- und C-Genom des amphidiploiden Rapses sein, mit der Folge von Markerlocus-Duplikationen. So korrespondierten in einer Kartierungsstudie (PIQUEMAL et al., 2005) die auch in vorliegender Untersuchung verwendeten Marker Ol11-B05 und Na12-E02 (Tab. 1) jeweils mit mehr als einem Locus in zwei verschiedenen Kopp-

Tab. 4. Genetische Ähnlichkeit (GS) nach Jaccard bei Vergleich aller Versuchsglieder, der Linien untereinander, der Hybriden untereinander sowie der Linien mit den Hybriden

	GS-Mittelwert	GS-Min.	GS-Max.
<u>Alle Versuchsglieder</u>			
SURL	0,54	0,26	1,00
BAZ	0,54	0,25	0,98
<u>Linien:Linien</u>			
SURL	0,48	0,26	1,00
BAZ	0,48	0,25	0,97
<u>Hybriden:Hybriden</u>			
SURL	0,65	0,47	0,96
BAZ	0,64	0,47	0,98
<u>Linien:Hybriden</u>			
SURL	0,54	0,29	0,91
BAZ	0,54	0,33	0,91

lungsgruppen. Desweiteren handelte es sich bei den 27 für die vorliegende Studie verwendeten molekularen Markern um genomische Mikrosatellitenmarker. Marker dieses Typs sind dafür bekannt, dass sie in Markerassays nicht selten zu multiplen Signalen oder „verschmierten“ Fragmentmustern führen, die eine Auswertung erschweren. Inzwischen sind eine Reihe von Mikrosatellitenmarkern bei Raps etabliert worden, die aus exprimierten Genbereichen (ESTs) abgeleitet sind (HOPKINS et al., 2007; LI et al., 2007a und 2007b). EST-basierte Mikrosatellitenmarker erlauben im Allgemeinen eine hohe Darstellungsqualität (HACKAUF und WEHLING, 2002), weisen allerdings im Vergleich zu genomischen Markern einen etwas geringeren Polymorphiegrad auf. Es wäre zu prüfen, ob mit EST-basierten Mikrosatellitenmarkern künftig eine noch sicherere Auswertung bei Sortenvergleichen möglich ist. Trotz der genannten Einschränkungen hinsichtlich der Qualität der Marker war die Reproduzierbarkeit der Markerergebnisse unter Verwendung von Mischproben aus je 40 Einzelpflanzen hoch, was sich in der sehr guten Wiederholbarkeit der Befunde innerhalb der beiden Labore auf der Grundlage jeweils zweier unabhängiger Mischproben zeigte.

Von den Abweichungen zwischen Markerbefunden und Erwartung, die auch nach Bekanntgabe der Elternlinien-Zuordnung an die beiden Labore bestehen blieben, waren die meisten vom Typ 2, bei welchem das in einer der beiden Hybrideltern vorhandene Markerfragment in der Hybride nicht nachweisbar war. Deutlich weniger Abweichungen waren vom Typ 1 oder 3. Es ist davon auszugehen, dass der größte Teil dieser unerwarteten Ergebnisse nicht auf methodische Fehler, sondern auf genetische Ursachen zurückzuführen ist. In vorliegender Studie wurde mit Mischproben gearbeitet, wobei die untersuchten Einzelpflanzen der Elternlinien nicht identisch mit jenen waren, die zur Herstellung der ebenfalls untersuchten Hybriden verwendet worden waren. Es ist nicht aus-

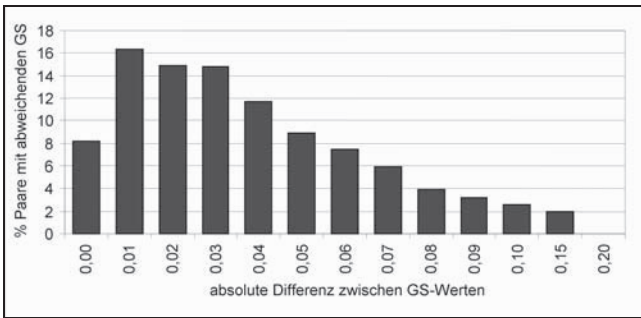


Abb. 2. Häufigkeitsverteilung der absoluten Differenzen zwischen GS-Werten der beiden Labore für alle paarweisen Vergleiche.

zuschließen, dass zwischen den zur Saatgutherstellung verwendeten und den untersuchten Elternlinien aufgrund von Restheterozygotie geringe genetische Unterschiede auf Markerebene existieren. Restheterozygotie einzelner Elternlinien kann, in Abhängigkeit vom Anteil des betreffenden Marker-Allels in der Mischprobe, zu positiven oder negativen PCR-Amplifikationsergebnissen und letztlich zu einem der drei Abweichtungstypen (Tab. 2) führen. Gesicherte Aussagen zu den Ursachen der verschiedenen Abweichungen und zum Ausmaß sortenspezifischer Abweichungen würden Einzelpflanzenanalysen von tatsächlichen Kreuzungseltern und Individuen der Sorte aus anderen Vermehrungen erfordern. Insbesondere bei den vier durch starke Abweichungen auffallenden Hybriden können Fehler in der Hybridproduktion nicht ausgeschlossen werden. Alle vier betreffenden Hybriden sind vor Abschluss der Prüfung zurückgezogen worden, so dass keine Aussage hinsichtlich der Homogenität in morphologischen Merkmalen gemacht werden kann.

Bemerkenswert an den Laborergebnissen ist, dass trotz unterschiedlicher Darstellungsmethodik für die Markeralysen die ermittelten mittleren genetischen Ähnlichkeiten für die beiden Labore sehr ähnlich, wenn nicht identisch, ausfielen und die Korrelation der GS-Werte zwischen den Laboren sehr eng war. Zusammen mit der guten Wiederholbarkeit der Ergebnisse innerhalb der Labore und der annähernd gleichen Anzahl persistenter Abweichungen (43 vs. 45, ohne die vier stark abweichenden Hybriden; Tab. 3) spricht dies für eine allgemein hohe und praktisch identische Präzision der in den beiden Laboren durchgeführten Analysen.

Dennoch bleiben kleinere Unterschiede im Einzelfall, die zeigen, wie wichtig die Harmonisierung der Methodik zwischen verschiedenen Laboren ist, um nicht nur sehr gut übereinstimmende, sondern zweifelsfreie Ergebnisse bei der amtlichen Untersuchung von Rapsmischproben mit Mikrosatellitenmarkern zu erhalten. Um identische Ergebnisse in verschiedenen Laboren zu ermöglichen und somit zwischen Abweichungen aufgrund genetischer Ursachen und Abweichungen aufgrund anderer Einflüsse unterscheiden zu können, wären detaillierte Richtlinien über die Verwendung von robusten Markern, definierten Reagenzien und Detektionstechnik unerlässlich.

Die vorliegende Studie zeigt des Weiteren, dass die Überprüfung der Zuchtformel nicht ohne Kenntnis des

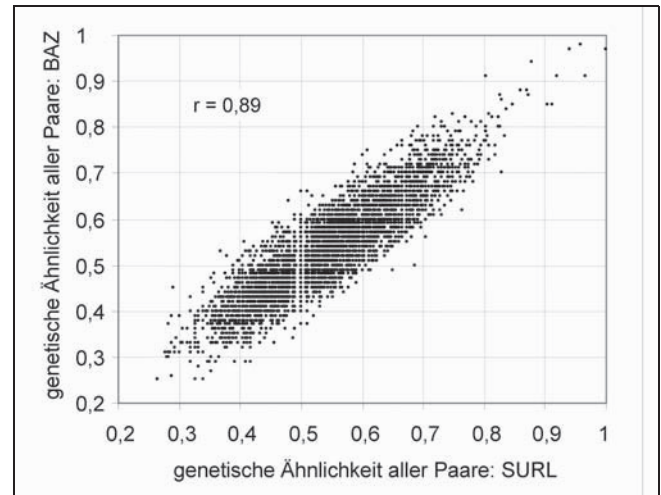


Abb. 3. Korrelation der GS für alle Paare von Versuchsgliedern auf Grundlage der BAZ- und SURL-Daten.

Sortentyps und der Hybrideltern möglich ist. Aufgrund gewisser Anteile von Restheterozygotie in den Linien kann nicht immer vom DNA-Fragmentmuster per se auf den Sortentyp geschlossen werden. Die Plausibilität der Zuchtformel kann relativ gut abgeschätzt werden, wenn die Elternlinien bekannt sind und die Ergebnisse in den Laboren übereinstimmen.

Die Entwicklung einer praktikablen Methodik zur eindeutigen Sortenidentifizierung erfordert weitere Untersuchungen. Mit den verwendeten 27 Markern unterschieden sich einige Hybriden nur in wenigen DNA-Fragmenten. Es wäre unter anderem zu prüfen, welche Unterschiede in den DNA-Fragmentmustern unter Beachtung der labor-technischen Aspekte hinreichend robust sind. Auch könnten Untersuchungen an Einzelpflanzen sowie an definierten Saatgutpartien aus verschiedenen Produktionsstufen und Produktionszyklen helfen, abweichende Signalmuster in den Hybriden zu bewerten. Durch Einsatz neuer Marker könnte gegebenenfalls der Polymorphiegrad erhöht und die Auswertbarkeit verbessert werden.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen gezeigt, dass es nicht möglich ist, aus allen Elternlinien die zu einer gegebenen Hybride gehörenden Eltern zuzuordnen. Eine zusätzliche Schwierigkeit besteht dann, wenn nicht bekannt ist, bei welchen Proben es sich um solche von Hybriden bzw. von Linien handelt. In einigen Fällen ist die Anzahl der DNA-Fragmentmuster diesbezüglich kein ausreichender Indikator. Eine eindeutige blinde Zuordnung von Hybriden und ihren Elternlinien wäre nur möglich, wenn die Marker kodominant und eindeutig auswertbar sind, der Satz ausgewählter Marker das Material stark genug differenziert und methodisch bedingte Abweichungen in den DNA-Fragmentmustern ausgeschlossen werden können. Da in vorliegender Studie für die meisten Hybriden nur relativ geringfügige Abweichungen von den erwarteten DNA-Fragmentmustern auftraten, scheint die hier angewandte Strategie indessen dazu geeignet, die Plausibilität von Zuchtformeln nachzuprüfen.

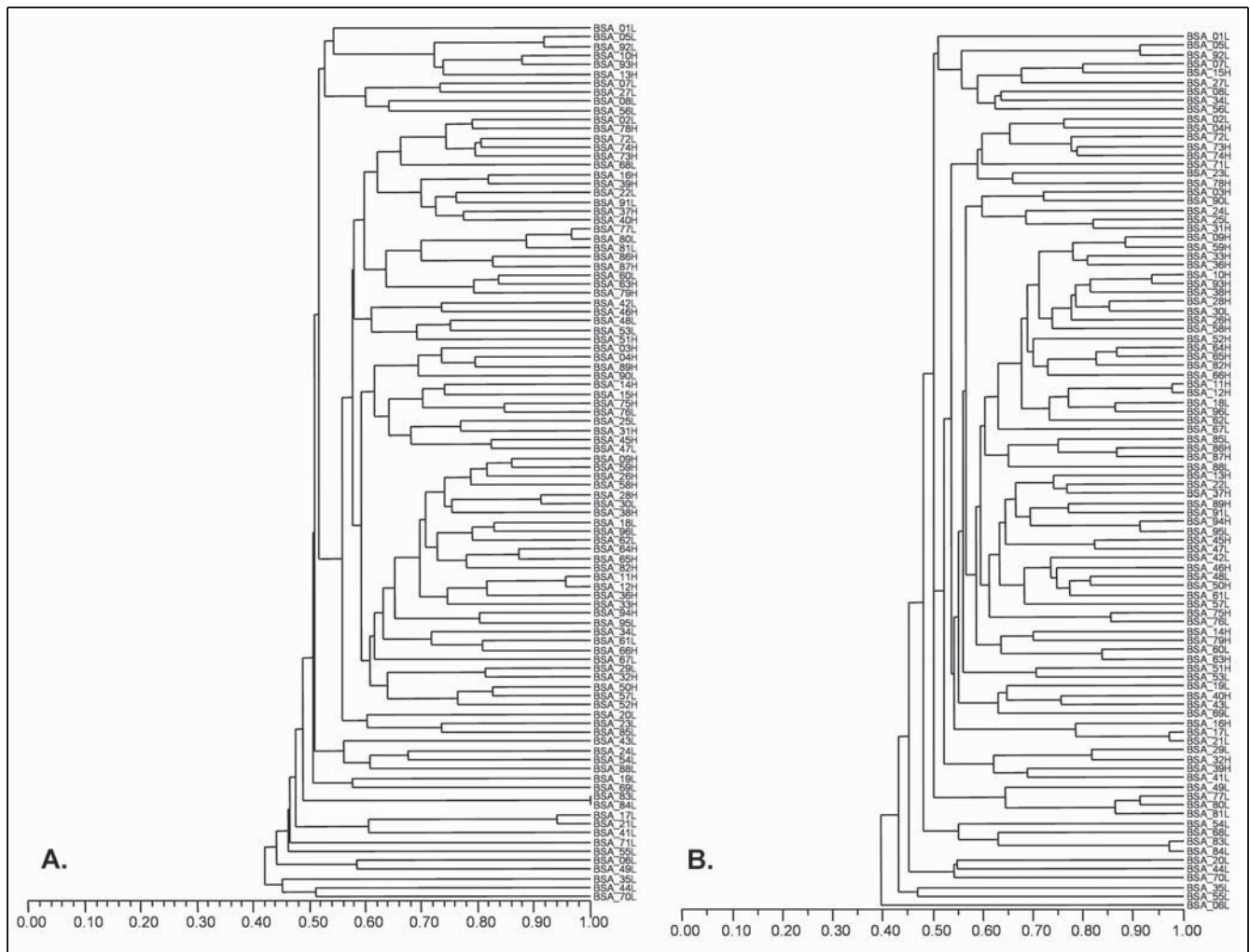


Abb. 4. UPGMA-Dendrogramm für 42 Hybriden, basierend auf 27 Mikrosatellitenmarkern; Ähnlichkeitsmaß Jaccard; A.: Labor SURL; B.: Labor BAZ.

Danksagung

Das Projekt wurde durch den Bundesverband Deutscher Pflanzenzüchter e.V. finanziell unterstützt.

Literatur

HACKAUF, B., P. WEHLING, 2002: Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome. *Plant Breeding* **121**, 17-25.
 HOPKINS, C.J., N.O.I. COGAN, M. HAND, E. JEWELL, J. KAUR, X. LI, G.A.C. LIM,

A.E. LING, C. LOVE, H. MOUNTFORD, M. TODOROVIC, M. VARDY, G.C. SPANGENBERG, D. EDWARDS, J. BATLEY, 2007: Sixteen new simple sequence repeat markers from *Brassica juncea* expressed sequences and their cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes* **7**, 697-700.
 LI, X.B., M.L. ZHANG, H.R. CUI, 2007a: Analysis of SSR information in EST resource of oilseed rape. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences* **29** (1), 20-25.
 LI, X.B., M.L. ZHANG, H.R. CUI, 2007b: Data mining for SSRs in ESTs and development of EST-SSR markers in oilseed rape. *Journal of Molecular Cell Biology* **40** (2), 137-144.
 PIQUEMAL, J., E. CINQUIN, F. COUTON, C. RONDEAU, E. SEIGNORET, I. DOUCET, D. PERRET, M.-J. VILLEGER, P. VINCOURT, P. BLANCHARD, 2005: Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* **111** (8), 1514-1523.