

Aus dem Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Reinhold Jahn)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
(Dekan: Prof. Dr. Peter Wycisk)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Fachgebiet: Pflanzenzüchtung

„Züchtung von Industrieroggen zur Bioethanolverwertung“

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

von

Diplomagraringenieurin Jeannette Rode

Halle/Saale 2009

Aus dem Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Reinhold Jahn)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
(Dekan: Prof. Dr. Peter Wycisk)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

„Züchtung von Industrieroggen zur Bioethanolverwertung“

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von

Diplomagraringenieurin Jeannette Rode

geb. am 05.05.1980 in Halle/Saale

Gutachter: 1. Gutachter: Prof. Dr. W. E. Weber
2. Gutachter: Prof. Dr. T. Miedaner
3. Gutachter: Prof. Dr. K. Pillen

Verteidigung am: 06.04.2009

Halle/Saale 2009

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	10
2.1 Pflanzenmaterial und Feldversuche	10
2.2 Merkmalerfassung	12
2.3 Molekulargenetische Methoden	16
2.3.1 DNA-Isolierung	16
2.3.2 SSR-Analyse	18
2.3.3 AFLP-Analyse	20
2.3.4 Entwicklung von PCR-Primern für Kandidatengene der Stärkebiosynthese	23
2.4 Datenanalyse	27
3 Ergebnisse	29
3.1 Untersuchung der Kalibrierungspopulation	29
3.2 Untersuchung der Hybridkombinationen	36
3.2.1 Ergebnisse der KWS Lochow	36
3.2.2 Ergebnisse der HYBRO	40
3.2.3 Bestimmung der Bioethanolausbeute	52
3.3 Molekulargenetische Verfahren	55
3.3.1 SSR-Analyse	55
3.3.2 AFLP-Analyse	58
3.3.3 Entwicklung von PCR-Primern für Kandidatengene der Stärkebiosynthese	63
3.4 Datenanalyse	72
3.4.1 Genetische Diversitätsanalyse	72
3.4.2 Assoziationsstudie	81
4 Diskussion	87
5 Zusammenfassung/Summary	108
6 Literaturverzeichnis	109
7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	126
8 Anhang	131

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Σ	Summe
a	annus
A	Adenin, Adenosin
α	Alpha
ADP	Adenyldiphosphat
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AGPase	ADP-glucose pyrophosphorylase
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β	Beta
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Cytidin
ca.	Zirka
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
cm	Centimeter
cM	Centimorgan
CMS	cytoplasmatisch-männliche Sterilität
CO ₂	Kohlendioxid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Desoxy
DDGS	Distillers' Dried Grains with Solubles
d.h.	das heisst
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
dt	Dezitonne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	Expressed Sequence Tag
et al.	und andere
ETBE	Ethyl-Tertiär-Butyl-Ether
etc.	et cetera
F	Forward
FG	Freiheitsgrad
G	Guanin, Guanosin
g	Gramm

µg	Mikrogramm
GABI	Genomanalyse im biologischen System Pflanze
GBSS	granule bound starch synthase
h	Stunde
h ²	Heritabilität
H ₂ O	Wasser
ha	Hektar
hl	Hektoliter
IPK	Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
IRD	Infra-Red Detectable
ISSR	Intersimple Sequence Repeat
JKI	Julius Kühn-Institut
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KWS	Kleinwanzlebener Saatzucht
l	Liter
L.	Linne, C. von, schwedischer Naturforscher
µl	Mikroliter
M	Molar
m ³	Kubikmeter
mA	MilliAmpere
Max	Maximalwert
Mb	Megabase
MBE	Mitteldeutsche Bioenergie GmbH
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Min	Minimalwert
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mPa.s	Megapascal pro Sekunde
MS	Mikrosatellit
MQ	Mittleres Abweichungsquadrat
n	Anzahl/Probenumfang
N	Stoffmenge in Mol
NCA	nasschemische Analyse
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
NITS	Nahinfrarot-Transmissions-Spektroskopie
NIRS	Nahinfrarot-Spektroskopie

nm	Nanometer
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Pollenelter
pH	potentia Hydrogenii
pmol	Pikomol
QTL	Quantitative Trait Loci
R	Korrelationskoeffizient
R	Reverse
R ²	Bestimmtheitsmaß
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REMS	Rye Expressed Microsatellite Sites
RNA	Ribonukleinsäure
RMS	Roggenmikrosatelliten
rpm	rotations per minute
s	Sekunde
S.	Seite
SAMPL	Selectively Amplified Microsatellite Polymorphic Locus
SBCMV	Soil-borne cereal mosaic virus
sbe	starch branching enzyme
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SCM	Secale Cereale Microsatellites
SE	Saatelter
SEP	Standardfehler
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
STS	Sequence Tagged Site
T	Thymin, Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TKM	Tausendkornmasse
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TS	Trockensubstanz
U	Unit
u. a.	unter anderem
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with the arithmetic Average
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
V	Volt
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

W	Watt
WEV	Wasserextraktviskosität
WSSMV	Wheat spindle streak mosaic virus
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Innerhalb der Familie der Süßgräser (*Gramineae*) wird die Gattung *Secale* in 4 Arten gegliedert (*S. montanum*, *S. cereale*, *S. vavilovii* und *S. silvestre*), wobei der Kulturroggen, *Secale cereale* L., die größte wirtschaftliche Bedeutung besitzt (Jung et al., in Druck). Alle Arten sind diploid mit $2n = 14$ Chromosomen und untereinander kreuzbar (Laube und Quadt, 1959).

Im Gegensatz zu Weizen und Gerste stellt Roggen eine sekundäre Kulturform dar (Brouwer, 1972). Vermutliche Heimat ist der Kaukasus, woher er wahrscheinlich als Unkraut zunächst nach Kleinasien und schließlich nach Europa gebracht wurde (Franke, 1997). Besonders auf ungünstigeren Standorten verdrängte er durch seine Robustheit andere Getreidearten und wurde bereits im 12. und 13. Jahrhundert in vielen Gebieten als Hauptbrotfrucht angebaut. Noch bis zum zweiten Weltkrieg übertraf die Anbaufläche des Roggens die des Weizens, wurde dann aber Mitte des letzten Jahrhunderts nahezu ganz vom Weizen verdrängt (Becker, 1993; Körber-Grohne, 1995). Nach Jahren des Rückgangs wurden im Durchschnitt der Jahre 1990 - 2001 wieder rund 800.000 ha Roggen in Deutschland angebaut. Mit dem Wegfall der Roggenintervention 2004 kam es jedoch zu drastischen Preiseinbrüchen und einer weiteren Verringerung der Aussaatfläche (Diepenbrock et al., 2005). Der Anbau belief sich in 2004 auf 624.000 ha (Statistisches Bundesamt, 2005). Bedingt durch die verstärkte Nutzung von Getreide als nachwachsender Rohstoff sowie den steigenden Absatz im Futtermittelsektor erlebt Roggen wieder einen Aufschwung. Die Anbaufläche von Winterroggen nahm dabei für das Erntejahr 2007 um 24 % im Vergleich zu 2006 auf 670.000 ha zu (Roggenforum, 2006; Statistisches Bundesamt, 2007). Hinter Russland und Polen ist Deutschland damit der drittgrößte Roggenproduzent, wobei weltweit der Anbau jedoch keine große Rolle spielt (Lütke Entrup und Oehmichen, 2000). Aufgrund seiner Trockentoleranz und seiner geringen Bodenansprüche wird Roggen vor allem auf leichten, niederschlagsarmen Standorten angebaut und ist dort oftmals die einzige Alternative.

In Deutschland konzentriert sich der Anbau auf die Bundesländer Brandenburg und Niedersachsen. Hier standen im Jahr 2006 347.900 ha Winterroggen (Schraa, 2007), was 65 % des gesamten deutschen Anbaus entsprach.

Als Brotgetreide hat sich Roggen einen festen Markt erkämpft. Der Anteil ist schon seit mehreren Jahren konstant bei rund 900.000 Tonnen (Roggenforum, 2007). Experten erwarten, dass der verstärkte Einsatz von Roggen als Futtermittelkomponente und

Energiegetreide zu einer Stabilisierung des Anbaus und damit auch des Preises führen könnte (Koop, 2007). Zur Ernte 2008 hat sich die Aussaatfläche um weitere 12 % ausgedehnt (Statistisches Bundesamt, 2008).

Roggenzüchtung

In Deutschland sind derzeit 40 Roggensorten (3 Sommerroggen, 32 Winterroggen-Körnernutzung, 5 Winterroggen-Grünschnittnutzung) zugelassen (Bundessortenamt, Stand 01.07.2008); darunter befinden sich 20 Populationssorten, 15 Hybridsorten und 5 synthetische Sorten. Die Winterform wird vorrangig angebaut, da höhere und stabilere Erträge realisiert werden als bei den wirtschaftlich unbedeutenden Sommerformen (Lütke Entrup und Oehmichen, 2000; Bickel-Sandkötter, 2001).

Seit der Einführung von Hybridsorten tritt die Bedeutung von Populationssorten in den Hintergrund, da ein deutlich höherer Zuchtfortschritt vor allem beim Kornertrag erzielt wurde (Geiger, 2007). Die Hybridzüchtung nutzt die volle Heterosis, mit der die Mehrleistung der Nachkommen gegenüber dem Mittel der Eltern bezeichnet wird. Das jeweilige Befruchtungssystem bestimmt maßgeblich die Höhe der Heterosis. So zeigen Fremdbefruchter wie Roggen und Mais eine höhere Mehrleistung als typische Selbstbefruchter wie Weizen und Gerste. Des Weiteren ist die Heterosis von der Art des Merkmales bzw. seiner Vererbung abhängig. Eine Kreuzung genetisch weit voneinander entfernter Genotypen trägt zu einer Steigerung der Mehrleistung bei (Becker, 1993). Dazu existieren für Roggen verschiedene genetische Pools, wie beispielsweise Carsten und Petkus, aus denen die Saat- und Pollenelterlinien im Zuchtprozess entwickelt werden (Fischbeck et al., 1985).

Hybridroggensorten sind üblicherweise Dreivegehybriden $(A \times B) \times C$, für deren Entwicklung 3 Linien notwendig sind. Abbildung 1 gibt einen Überblick zum Zuchtschema. Zunächst werden die Linien aus den genetischen Pools gewonnen und durch mehrfache Selbstung der Pflanzen bis zur ausreichenden Homozygotie gebracht. Die selektierten Inzuchtlinien werden anschließend hinsichtlich ihrer Eigenleistung bewertet.

Ein häufig genutzter Mechanismus ist die cytoplasmatisch-männliche Sterilität (CMS). Dabei wird zunächst die Sterilität der Linie A durch Einlagerung des CMS-Plasmas über mehrmalige Rückkreuzungen erzeugt. Mit einer fertilen Linie B wird bestäubt, und

man erhält pollensterile Nachkommen. Es erfolgen mehrere Testkreuzungen zur Identifizierung von Linien mit maximaler Kombinationseignung. Die pollensterilen CMS-Einfachkreuzungen werden anschließend mit der Vaterlinie C (Restorer-Synthetiks) gekreuzt, die mit Hilfe von Restorergerne die Sterilität der Hybridsorte aufhebt.

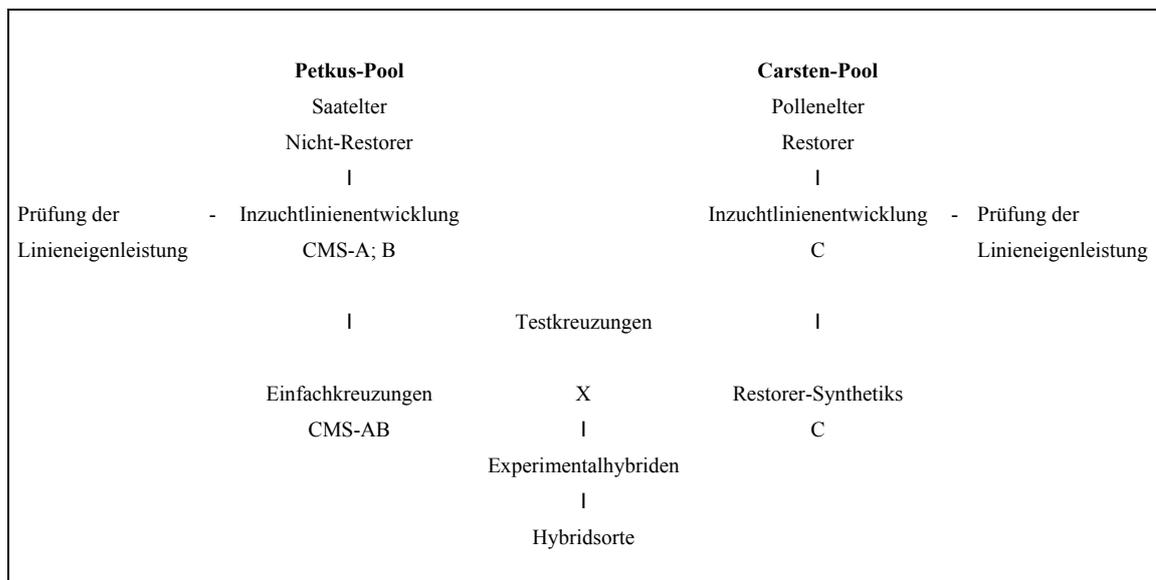


Abbildung 1: Schema zur Entwicklung von Roggenhybriden (nach Miedaner, 2007)

Im Vergleich zu Populationssorten erzielen Hybriden bis zu 20 % höhere Erträge und gleichen somit den erhöhten Saatgutpreis von 30 bis 50 €/dt wieder aus. Allerdings geht der Sortencharakter bei Nachbau des Erntegutes von Hybridsorten unvermeidbar verloren bzw. führt zu erheblichen Ertragseinbußen. So muss das in der Praxis zum Anbau gelangende Saatgut durch kontrollierte Kreuzung der Inzuchtlinien immer wieder neu erzeugt werden (Schmalz, 1980). Für die Züchter ist dies ein Vorteil, da somit ein natürlicher Sortenschutz gewährleistet wird.

Wichtige Zuchtmerkmale bei der Entwicklung neuer Roggensorten sind insbesondere Kornertrag, Krankheitsresistenzen, Backqualität, Standfestigkeit, Auswuchsfestigkeit, Tausendkornmasse, Rohproteingehalt und Kurzstrohigkeit. Sie orientieren sich in erster Linie an die vom Bundessortenamt gestellten Anforderungen für die Wertprüfung. Bedeutende Krankheiten sind beispielsweise der Echte Mehltau (*Erysiphe graminis* f. sp. *secalis*), Braunrost (*Puccinia dispersa*), Mutterkorn (*Claviceps purpurea*), Fusariosen (*Fusarium nivale*, *Fusarium culmorum*) und *Rhynchosporium-*

Blattfleckenkrankheit (*Rhynchosporium secalis*), die zu erheblichen Ertragseinbußen im Anbau führen können (Lütke Entrup und Oehmichen, 2000). Des Weiteren kann Roggen von bodenbürtigen Viren (Wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV) und Soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV)) befallen werden (Obst und Gehring, 2002). Eine Infektion in frühen Entwicklungsstadien führt zu Zwergwuchs und Ertragsverlusten von bis zu 50 % (Rodemann, 2007). Neben entsprechenden ackerbaulichen Maßnahmen können zur Bekämpfung resistente Sorten angebaut werden (Huth, 2002).

Der globale Klimawandel stellt für die Züchtung eine neue Herausforderung dar, denn häufige Stresssituationen machen die Pflanzen anfälliger für biotische und abiotische Krankheiten sowie Schaderreger. Dementsprechend bekommen Eigenschaften wie Robustheit gegenüber Trockenheit, Salz- und pH-Stress zunehmende Bedeutung. Roggen zeigt hier bereits die größte Toleranz aller Getreidearten.

Einen Beitrag zum Klimaschutz leisten nachwachsende Rohstoffe aus Biomasse, zu denen auch der Roggen gehört. Damit ergeben sich neue Zuchtziele bei der Entwicklung geeigneter Sorten. Für die Verwendung in Biogasanlagen spielt der Gehalt an organischer Trockensubstanz eine entscheidende Rolle, während für die Herstellung von Kunststoffen oder Bioethanol in erster Linie der Stärkeertrag von Bedeutung ist.

Stand der Biotechnologie bei Roggen

Um den Zuchtfortschritt zu beschleunigen, bedient sich die Roggenzüchtung moderner Methoden der Biotechnologie, wie beispielsweise der markergestützten Selektion. Es ist wichtig, dass möglichst früh im Zuchtprozess schon indirekt selektiert und damit auf aufwändige sowie kostspielige Analysen verzichtet werden kann. Eine markergestützte Selektion ist sowohl bei qualitativ als auch bei quantitativ vererbten Eigenschaften möglich. Bei quantitativ vererbten Merkmalen, zu denen beispielsweise auch die Stärke im Roggen gehört, können über eine QTL (Quantitative Trait Loci) –Analyse wichtige Chromosomenabschnitte lokalisiert werden (Lander und Botstein, 1989).

Der diploide Roggen besitzt eine Genomgröße von 7600 Mb. In verschiedenen Studien sind bereits genetische Karten erstellt wurden. Hierbei kamen zunächst Isoenzymmarker (Wricke und Wehling, 1985; Wricke et al., 1993) und in der Weiterentwicklung

verschiedene DNA-Marker wie AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) und SSRs (Simple Sequence Repeats = Mikrosatelliten) (Devos et al., 1993; Philipp et al., 1994; Senft und Wricke, 1996; Saal et al., 1997; Korzun et al., 2001; Hackauf und Wehling, 2002a, 2002b; Bednarek et al., 2003) zur Anwendung. Auf Grundlage dessen konnten bereits molekulare Marker detektiert werden, die in der Roggenzüchtung Verwendung finden, so zum Beispiel für die Selektion der Restorerfähigkeit, von Krankheiten und Qualitätseigenschaften. QTL-Analysen sind für zahlreiche agronomische Merkmale durchgeführt worden (Börner et al., 1999, 2000; Mohammadi et al., 2003; Bolibok et al., 2007; Masojc et al., 2007; Milczarski und Masojc, 2007). Zunehmend werden in Roggenstudien auch SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) verwendet, die auf Einzelnukleotidunterschieden beruhen und in anderen Kulturarten vor allem im Rahmen von Kartierungs- sowie Assoziationsstudien bereits genutzt wurden (Hafer: Chen et al., 2007; Weizen: Ravel et al., 2007).

Molekulare Marker finden auch im Rahmen von genetischen Diversitätsuntersuchungen Anwendung (Bolibok et al., 2005). Verschiedene Zuchtlinien werden hierbei über molekulare Marker auf DNA-Unterschiede untersucht, um deren Verwandtschaftsgrad zu ermitteln und damit geeignete Kreuzungspartner zu selektieren. Wird eine hohe genetische Distanz zwischen den Elternlinien festgestellt, ist mit einem hohen Heterosiseffekt in der Nachkommenschaft zu rechnen.

Des Weiteren wurden molekulare Marker für phylogenetische Studien innerhalb der Gattung *Secale* L. verwendet, um verwandtschaftliche Beziehungen zu definieren (Shang et al., 2006).

Eine Vielzahl der bei Roggen erfassten molekularen Informationen können im Internet unter [www.desicca.de/Rye gene map](http://www.desicca.de/Rye_gene_map) abgerufen werden (Schlegel und Korzun, 2007).

Einige Methoden der Biotechnologie konnten bisher für den Roggen noch nicht etabliert werden. Beispielsweise verhindert die schlechte Regenerierbarkeit in der Zell- und Gewebekultur den Einstieg dieser Getreideart in die Gentechnologie. Auch Doppelhaploide, die bereits routinemäßig in Gerste, Weizen und Mais den Zuchtprozess beschleunigen, konnten für Roggen bisher nur sehr ineffizient erzeugt werden (Miedaner, 2007).

Roggen als Rohstoff für die Bioethanolproduktion

In Deutschland haben sich bereits drei große Bioethanolanlagen mit einer Produktionskapazität von insgesamt 590.000 m³/a etabliert, die zunächst Getreide als Rohstoff einsetzten. Vor allem die Werke in Zörbig und Schwedt verwendeten zum überwiegenden Teil Roggen, während in Zeitz vorrangig Weizen genutzt wurde (Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, 2006; Böse, 2007). Nach einem drastischen Anstieg der Getreidepreise im Jahre 2007 wird nun zum überwiegenden Teil auf Zucker als Bioethanolrohstoff zurückgegriffen. Es bleibt abzuwarten, inwieweit sich dieser Markt in der nächsten Zeit verändern wird.

Roggen enthält wie auch andere Getreidearten mit Korn und Stroh zwei unterschiedlich energiehaltige Erntekomponenten. Die Verwendung der Energie der gesamten Pflanze für Biokraftstoffe ist von Oest (2000) dargestellt worden. Dabei werden alle Kohlenstoff- und Wasserstoffanteile der Biomasse zunächst in Kohlenmonoxid und Wasserstoff umgewandelt. Von der Ganzpflanzenverwertung wird in den bereits bestehenden, deutschen Werken allerdings derzeit noch abgesehen, da sich Kornmassen besser lagern lassen und eine höhere Transportwürdigkeit aufweisen. Somit werden lediglich die Kornpartien von den Landwirten geliefert und deren Stärkegehalt vorab über Nahinfrarot-Spektroskopie analysiert. Es wird ein Preisbonus für hohe Stärkegehalte von den Firmen geboten, da dieser eine Voraussetzung für eine hohe Bioethanolausbeute ist. Dementsprechend sollte das Getreide ein hohes Stärke-Ertragspotenzial aufweisen.

Auch andere Korninhaltsstoffe und –eigenschaften haben einen Einfluss auf die Alkoholausbeute und sollten bei der Rohstoffauswahl bzw. bereits bei der Züchtung geeigneter Sorten Beachtung finden. Eine gute Kornausbildung ist wichtig, da Stärke während der Kornfüllungsphase eingelagert wird. Somit sind ein hohes Hektolitergewicht und eine hohe Tausendkornmasse indirekte Merkmale für einen hohen Stärkegehalt. Des Weiteren ist bei Getreidepartien auf einen geringen Proteingehalt zu achten, denn es existiert eine negative Korrelation zwischen Stärke- und Proteingehalt. Bei Roggen beeinflusst auch der Gesamtpentosangehalt (lösliches und unlösliches Pentosan) die Alkoholausbeute. In der Bioethanolproduktion stellen die löslichen Pentosane unerwünschte Begleitstoffe dar (Kaltschmitt und Hartmann, 2001). Eine hohe Enzymaktivität ist von Vorteil, da sie den Einsatz von Fremdenzymen im

Produktionsprozess reduzieren kann. Die Kornqualität zur Ernte spielt für die industrielle Nutzung eine untergeordnete Rolle. Allerdings ist ein geringer Mutterkornbesatz und *Fusarium*gehalt von Bedeutung, wenn Koppelprodukte der Produktion als Futter Verwendung finden sollen (Schmitz, 2003).

Speziell für die Bioethanolherstellung gezüchtete Roggensorten existieren bislang nicht. Allerdings erfüllen bereits einige vorhandene Sorten die genannten Grundanforderungen und werden als Rohstoff eingesetzt.

Zu Beginn des Produktionsprozesses wird die in den Kornpartien vorhandene Pflanzenstärke zunächst enzymatisch in Zucker umgewandelt. Es entsteht Maische, die anschließend vergoren und zu Alkohol destilliert wird (Kaltschmitt und Hartmann, 2001). Zurück bleibt die Schlempe als entalkoholisierter Reststoff, der als Futtermittel vermarktet oder in einer Biogasanlage genutzt werden kann. Das Bioethanol wird anschließend entwässert und ist eine Alternative zu Ottokraftstoffen. Es kann als reiner Kraftstoff, in verschiedenen Mischungsanteilen oder ETBE (Ethyl-Tertiär-Butyl-Ether; Additiv zur Erhöhung der Klopfestigkeit) verwendet werden (Seyfried, 2006). Daneben gibt es noch weitere ökologisch interessante Einsatzmöglichkeiten als Lösungsmittel, Reinigungsmittel oder Rohstoff der chemischen Industrie (Schmitz, 2003).

Die Verwendung von Bioethanol in der Kraftstoffindustrie leistet einen Beitrag zur Schonung fossiler Energieträger und hilft klimaschädliche CO₂-Emissionen im Verkehrssektor zu reduzieren. Des Weiteren wird die Abhängigkeit von Rohstoffimporten verringert (Picard, 2006) und neben einer Stabilisierung der Erzeugerpreise in der Landwirtschaft können stillgelegte Ackerflächen wieder sinnvoll genutzt werden. Aus diesen Gründen besteht seit Januar 2007 in Deutschland eine Beimischungspflicht. Derzeit beläuft sich diese auf 1,2 % Bioethanol im Benzin. Bis zum Jahre 2015 sollen 6,6 % des gesamten Kraftstoffbedarfs in der EU durch Bioethanol ersetzt werden. Für Serien-Ottomotoren können bis zu 10 % Ethanol problemlos beigemischt werden. Die Verwendung von reinem Ethanol erfordert allerdings Spezialmotoren (Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft, 2006). In anderen Ländern, wie beispielsweise Schweden, werden diese problemlos seit mehreren Jahren eingesetzt (Bernhardt, 2006).

Weltweit ist Bioethanol bereits der wichtigste regenerative Kraftstoff (Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft, 2006). Die Produktion aus Roggen hat dabei bisher

eine geringe Bedeutung. In Brasilien und den USA, wo Bioethanol in großem Umfang produziert wird, werden hauptsächlich Zuckerrohr bzw. Mais eingesetzt.

Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Bewertung von Roggen als Rohstoff für die Bioethanolproduktion. Ausgangspunkt dafür war die Erfassung der genetischen Variabilität im Roggen hinsichtlich der Hauptmerkmale Kornertrag, Stärkeertrag, Stärkegehalt, Proteingehalt und Pentosengehalt. Deshalb wurden zu Beginn der Arbeiten an 102 Roggengenotypen (aktuelles Zuchtmaterial, Genbankherkünfte, Sorten) Kalibrierungskurven zur Bestimmung von Stärke-, Protein- und Pentosengehalt mittels Nahinfrarot-Spektroskopie entwickelt. Diese Kalibrierungskurven sollten während der Untersuchung für die Evaluierung von Versuchsmaterial genutzt werden, werden aber auch zukünftig durch die Integration weiterer Roggengenotypen optimiert.

Des Weiteren bot sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit, das von Vuylsteke et al. (2000) bei Mais erfolgreich genutzte Konzept erstmals auch bei Roggen auf seine Brauchbarkeit zu prüfen. Gegenstand dieses Konzeptes ist es, auf der Basis von AFLP- und SSR-Markerdaten bzw. von allelspezifischen Primern von Kandidatengenomen, die an den elterlichen Linien erfasst werden, Vorhersagen auf die Qualitätsmerkmale der zugehörigen Einfachhybriden zu treffen und damit den Zuchtprozess zu beschleunigen.

Elterliche Roggeninzuchtlinien der Züchter KWS Lochow GmbH und HYBRO Saatzucht GmbH & Co. KG wurden für die Analyse polymorpher Marker (AFLP und SSR) genutzt. Diese Inzuchtlinien waren die Eltern in faktoriellen Kreuzungsplänen zur Erzeugung von Hybriden. An den Hybriden wurden phänotypische Merkmale und Qualitätsmerkmale als Parametern für die Bioethanolgewinnung erfasst, die gemeinsam mit den Markerdaten der Elterlinien als Grundlage für eine Assoziationsstudie dienen.

Des Weiteren wurden Primer entwickelt, die Abschnitte in Genen amplifizieren, die für Enzyme des Stärkemetabolismus kodieren. Es handelte sich hierbei in erster Linie um AGPase (ADP-glucose pyrophosphorylase), die maßgeblich an der Synthese von ADP (Adenyldiphosphat)-Glucose beteiligt ist, stärkegebundene Synthasen (GBSS, granule bound starch synthase) für die Amylosesynthese und Stärkeverzweigungsenzyme (sbe, starch branching enzyme) für die Amylopektinsynthese. Die entwickelten Primer

wurden auf Vorhandensein und Polymorphie in den Roggenlinien geprüft und die Ergebnisse ebenfalls innerhalb einer Assoziationsstudie verrechnet.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Feldversuche

Basis für die Züchtung von speziellen Roggensorten für die Bioethanolproduktion ist die Beurteilung des genetischen Potenzials innerhalb dieser Kulturpflanze. Für die Evaluierung wurde eine Kollektion, bestehend aus 102 Roggenlinien und -sorten, zusammengestellt. Diese beinhaltet 36 Akzessionen der Genbank des Leibniz-Institutes Gatersleben (IPK, Deutschland; R1 - R36), 36 verschiedene Linien aus einem Zuchtprogramm der Professur für Pflanzenzüchtung in Halle (Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Deutschland; R37 - R72) und jeweils 15 Linien bzw. Sorten von den Roggenzüchtern KWS Lochow GmbH (R73 - R87) und HYBRO GmbH & Co. KG (R88 - R102). Die Roggenkollektion diente der Erfassung der genetischen Variabilität und wurde zur Entwicklung von Kalibrierungskurven für die Bestimmung von Stärke-, Protein- und Pentosangehalt mittels Nahinfrarot-Spektroskopie genutzt.

Für die molekularen Untersuchungen wurde aktuelles Zuchtmaterial der am Projekt beteiligten Roggenzüchter verwendet: 4 Saat- und 32 Polleneltern von der KWS Lochow und 23 Saat- und 6 Polleneltern von der HYBRO. Es handelt sich jeweils um Inzuchtlinien nach der zweiten Selbstung, so dass das Material einen hohen Homozygotiegrad aufwies.

Abbildung 2 gibt einen Überblick zum Aufbau der Feldversuche. Das Set von jedem Züchter wurde separat betrachtet. Für Leistungsprüfungen wurden die Eltern faktoriell miteinander gekreuzt. Für das Erntejahr 2005 wurde das Faktorial der KWS Lochow in 2 Serien und jeweils 2 Wiederholungen in Bernburg (Sachsen-Anhalt), Petkus (Brandenburg), Prislisch (Mecklenburg-Vorpommern), Seligenstadt (Bayern) sowie Falencin und Kontratowice (Polen) angebaut. Das Material der HYBRO wurde im selben Jahr in 3 Serien mit jeweils 2 Wiederholungen in Kleptow (Mecklenburg-Vorpommern), Moosburg (Bayern), Wulfsoede sowie Cappeln (Niedersachsen) und Poznan (Polen) untersucht. Die Versuche der HYBRO wurden mit dem gleichen Aufbau für das Erntejahr 2006 an den Standorten Kleptow, Moosburg, Wulfsoede und Poznan wiederholt. Die Saateltern der KWS Lochow sowie die Polleneltern der HYBRO werden im Folgenden auch als Tester bezeichnet.

Alle Merkmale (Ertrags- und Qualitätsmerkmale, Krankheitsbonituren etc.), die für eine Assoziationsstudie genutzt werden sollten, wurden an den Hybridkombinationen im Feld erfasst.

KWS Lochow	HYBRO
32 Polleneltern: LP01 ... LP32 4 Saateltern: LP37 ... LP40	6 Polleneltern: HYPE1 ... HYPE6 23 Saateltern: HYL01 ... HYL23
2 Serien:	3 Serien:
001: LP37 x LP01 ... LP32 LP38 x LP01 ... LP32 002: LP39 x LP01 ... LP32 LP40 x LP01 ... LP32	001: HYL01 ... HYL23 x HYPE3 HYL01 ... HYL23 x HYPE5 002: HYL01 ... HYL23 x HYPE1 HYL01 ... HYL23 x HYPE2 003: HYL01 ... HYL23 x HYPE4 HYL01 ... HYL23 x HYPE6
6 Orte in 2005 2 Wiederholungen / Ort	5 Orte in 2005 4 Orte in 2006 2 Wiederholungen / Ort

Abbildung 2: Aufbau der Feldversuche von KWS Lochow und HYBRO

2.2 Merkmalerfassung

Merkmalerfassung an der Kalibrierungspopulation

Von allen 102 Roggengenotypen wurden zunächst das Hektoliter (hl)-Gewicht und die Tausendkornmasse (TKM) erfasst. Das durchschnittliche hl-Gewicht wurde mit einem 1 Liter-Getreide-Tester der Firma Baumann Saatzuchtbedarf (Waldenheim, Deutschland) ermittelt. Für die Feststellung der Tausendkornmasse wurden 4 x 100 Körner gewogen. Die Saatkornanalysen, insbesondere die Erfassung von Länge, Breite und Fläche von 2 x 100 Roggenkörnern, erfolgten mit dem Saatkornanalysegerät MARVIN (GTA Sensorik GmbH, Neubrandenburg, Deutschland) in Kooperation mit dem IPK Gatersleben.

Der Stärke- und Proteingehalt ganzer Getreidekörner wurde mit dem InfratecTM 1241 (Nahinfrarot-Transmissions-Spektroskop (NIT); Foss, Hamburg, Deutschland) ermittelt und der Proteingehalt umgerechnet in Proteingehalt in der Trockensubstanz (TS). Diese Analyse wurde von der MBE (Mitteldeutsche Bioenergie GmbH) in Zörbig (Deutschland) durchgeführt.

Zusätzlich zur Infratec-Untersuchung wurde eine nasschemische Analyse der gesamten Roggenkollektion im Institut für Pflanzenzüchtung und Akklimatisierung (Radzikow, Polen) in Auftrag gegeben. Dazu wurden 15 g von jeder Probe vermahlen. Je Genotyp erfolgte eine Doppelbestimmung, wobei das Rohprotein (Kjeldahl N x 6.25) nach AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1990; Methode 976.05) bestimmt wurde. Der Gehalt an löslichem Pentosan wurde nach Hashimoto et al. (1987), modifiziert von Delcour et al. (1989), kolorimetrisch erfasst. Die Viskosität wurde im Wasserextrakt nach dem Schütteln von 0,5 g Getreide mit 5 ml destillierten Wasser für 1 h bei 30°C mit einem Wells-Brookfield Cone Plate Digital Viscometer (Brookfield Engineering Laboratories GmbH, Pinnacles West Harlow, Essex, England; Boros et al. 1993) ermittelt.

Beim Julius Kühn-Institut (JKI) in Braunschweig (Deutschland) konnten an den 102 Genotypen der Roggenkollektion der Stärkegehalt nach Ewers und der Gesamtpentosengehalt bestimmt werden.

Entwicklung von Kalibrierungskurven

Da nasschemische Analysen zur Bestimmung von Qualitätsparametern sehr kostspielig und zeitintensiv sind, bot die Nahinfrarot-Spektroskopie eine Alternative. Die für diese Untersuchungen zur Verfügung stehenden Geräte können mit verschiedenen Kalibrierungskurven der Hersteller ausgestattet werden, jedoch bietet die eigene Entwicklung die Möglichkeit, eine Anpassung an das zu untersuchende Material vorzunehmen. Mit den erhobenen Daten der 102 Genotypen der Roggenkollektion wurden von Herrn Dr. Peter Tillmann (VDLUFA Qualitätssicherung NIRS GmbH, Kassel, Deutschland) erste Kurven zur Ermittlung von Stärke-, Protein- und Pentosengehalt des im Projekt bearbeiteten Zuchtmaterials erstellt.

Es wurden 68 Proben für die Kalibrierung genutzt, wobei die Auswahl nach dem Zufallsprinzip erfolgte. Die restlichen Genotypen (insgesamt 34) dienten der Validierung, um die Genauigkeit der Kalibrierung im Vergleich mit den Ergebnissen der nasschemischen Analysen (Referenzmethoden) zu schätzen.

Für die Kalibrierung auf einem Infratec-Gerät (InfratecTM 1241, Foss GmbH) der KWS Lochow war keine vorherige Vermahlung des Korngutes notwendig. Zunächst wurden die Spektren in einem Wellenbereich von 850 bis 1050 nm gemessen. Die Entwicklung von Kalibrierungsfunktionen erfolgte mit der Software „The Unscrambler“ Version 9.01 der Firma CAMO PROCESS AS (Oslo, Norwegen).

Für die Kalibrierung eines NIRSystems-Gerätes (NIRSystems 6500, Foss GmbH, Rellingen, Deutschland) wurden die Körner der Roggenkollektion zunächst vermahlen und in einem Wellenbereich von 1100 bis 2500 nm deren Reflektionsspektren gemessen. Die Kurvenentwicklung erfolgte mit der WIN-ISI Software Version 1.04a der Firma Infrasoftware International LLC. (Silver Spring, USA).

Ziel war es eine Kalibrierung zu entwickeln, die einen möglichst hohen Korrelationskoeffizient (r) zwischen den Ergebnissen der Referenzmethode und den aus den Reflektionsspektren ermittelten Werten, einen kleinen Standardfehler (SEP; gibt an, wie stark die Differenzen zwischen Labor- und Nahinfrarot-Werten noch streuen) und kleinen Bias (systematischer Fehler bzw. systematische Differenz zwischen den Nahinfrarot- und den Referenzwerten) liefert. Ein guter SEP sollte in der gleichen Größenordnung liegen wie die Wiederholungsstandardabweichung der Labormethode (Baumgartner et al., 2007). Als Kriterium für die Schätzgenauigkeit der Kalibrierung wird der Standardschätzfehler (SEP (C); Standardfehler um Bias

korrigiert) verwendet, der wie folgt berechnet wird (Marten, 1986; zitiert durch Song und Otto, 1995):

$$\text{SEP (C)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(\hat{Y}_i - Y_i) - \text{Bias}]^2}{n - 1}}$$

$$\text{Bias} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - Y_i)$$

n...Anzahl der Proben

\hat{Y}_i ...Schätzwert der Nahinfrarot-Analyse

Y_i ...Referenzwert der nasschemischen Analyse

Merkmalerfassung an den Hybriden

Alle Merkmale, die für eine Assoziationsstudie genutzt werden sollten, wurden an den Hybridkombinationen am jeweiligen Standort erfasst, varianzanalytisch verrechnet und für die Assoziationsstudien genutzt.

An den Hybriden der KWS Lochow wurden für das Erntejahr 2005 an 6 Standorten folgende Merkmale erhoben:

- Stärkegehalt (% in TS)
- Proteingehalt (% in TS)
- Kornertrag (dt/ha)
- Stärkeertrag (dt/ha; berechnet aus Kornertrag x Stärkegehalt / 100)
- Hektolitergewicht (kg/100 l)
- Tausendkornmasse (g)
- Pflanzenhöhe (cm)

An den Hybriden der HYBRO wurden für die beiden Erntejahre 2005 und 2006 folgende Merkmale erfasst:

- Stärkegehalt (% in TS); 2005 und 2006: 3 Standorte
- Proteingehalt (% in TS); 2005 und 2006: 3 Standorte
- Kornertrag (dt/ha); 2005: 5 Standorte; 2006: 4 Standorte

- Stärkeertrag (dt/ha; berechnet aus Kornertrag x Stärkegehalt / 100)
- Hektolitergewicht (kg/100 l); 2005 und 2006: 3 Standorte
- Tausendkornmasse (g); 2005 und 2006: 3 Standorte
- Pflanzhöhe (cm); 2005: 5 Standorte; 2006: 4 Standorte
- Fallzahl (s); 2005 und 2006: 3 Standorte
- Braunrost (Boniturnoten von 1 bis 9, wobei 1 = resistent und 9 = anfällig);
2005 und 2006: 2 Standorte
- Mehltau (Boniturnoten von 1 bis 9, wobei 1 = resistent und 9 = anfällig);
2005: 3 Standorte; 2006: 1 Standort
- Kornbreite (mm); 2005: 3 Standorte
- Kornlänge (mm); 2005: 3 Standorte

Die Korninhaltsstoffe Protein und Stärke wurden jeweils nach der Ernte mittels Nahinfrarot-Spektroskopie und den dafür von Herrn Dr. Tillmann erstellten Kalibrierungskurven ermittelt.

Bestimmung der Bioethanolausbeute

In Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Thomas Senn von der Universität Hohenheim (Deutschland) konnte die Bioethanolausbeute an 27 Hybriden des Erntejahres 2005 ermittelt werden (das Protokoll für diese Analyse befindet sich im Anhang A1, S. 131). Dies waren 15 Hybriden aus der Versuchsserie 1 vom Standort Prislach (erste Wiederholung) der KWS Lochow und 12 Hybriden der HYBRO, jeweils eine Mischprobe über die verschiedenen Versuchsstandorte und -serien. Bei drei der HYBRO-Hybriden wurden jeweils zwei Saatgut-Proben analysiert, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu prüfen.

2.3 Molekulargenetische Methoden

Eine Liste für die innerhalb der molekularen Analysen häufig verwendeten Puffer und Lösungen ist im Anhang unter A2 dargestellt (S. 133).

2.3.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung der HYBRO-Inzuchtlinien wurde in der Professur für Pflanzenzüchtung der Universität Halle in Anlehnung an das Cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB)-Protokoll nach Saghai-Marooft et al. (1984) durchgeführt.

Gefrorenes Blattmaterial wurde zunächst in flüssigem Stickstoff fein gemörsert, in ein Reaktionsgefäß mit 9 ml CTAB-Extraktionspuffer überführt und 30 min in 65°C heißem Wasserbad geschüttelt. Danach wurden 4,5 ml Chloroform/Oktanol (24:1) zugegeben und für 5 min sanft geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation von 15 min bei 20°C und 3000 rpm. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 10 ml kalten 100-prozentigen Ethanol erfolgte ein vorsichtiges Mischen bis die DNA präzipitierte. Die Lösung wurde für ca. 1 h bei -20°C aufbewahrt. Diese Zeit konnte verkürzt werden, wenn die DNA bereits gut präzipitiert war. Es folgte eine Zentrifugation von 20 min bei 4°C und 4000 rpm. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und 1 ml 76-prozentiges Ethanol, 0,2 M Natriumacetat zugegeben. Das Material stand für 20 min bei Raumtemperatur und wurde anschließend für 10 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig entfernt und 1 ml 76-prozentiges Ethanol, 10 mM Ammoniumacetat zugefügt. Nach 1 min bei Raumtemperatur wurde für 10 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgegossen und 1 ml 70-prozentiges Ethanol zugefügt. Erneut erfolgte nach einer Minute Abwarten bei Raumtemperatur eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 4000 rpm. Der Überstand wurde ein letztes Mal entfernt und die DNA getrocknet. Danach wurden 500 µl 1x TE-Puffer (pH 8,0) zugegeben und über Nacht bei 4°C gelagert. Alle ungelösten Bestandteile wurden anschließend durch kurzes Zentrifugieren gesammelt und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Für den Verdau der RNA wurden 2 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben und eine Stunde bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Nach Zugabe von 1 Volumen Phenol erfolgten 5 min Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1400 rpm. Anschließend wurden weitere 5 min bei Raumtemperatur und 14000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase konnte in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben werden. Es folgten 5 min und 1400 rpm im Thermomixer bei Raumtemperatur und eine anschließend 5-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 14000 rpm. Die obere wässrige Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumen 100-prozentigem Ethanol vorsichtig gemischt. Nach ca. 12 h bei -20°C erfolgte zur DNA-Reinigung eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, 500 µl 70-prozentiges Ethanol zugegeben und für 10 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und nach Abgießen des Überstandes die restliche Flüssigkeit abpipettiert. Das Reaktionsgefäß kam für ca. 2-3 min mit offenem Deckel in einen Vakuum-Konzentrator. Danach wurden ca. 300 µl 1x TE Puffer (pH 8,0) zugegeben und für 1 h bei 37°C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend erfolgte eine Lagerung bei 4 bzw. -20°C.

Die DNA der Saat- und Polleneltern der KWS Lochow wurde in einem betriebseigenen Labor isoliert und der Universität für die Analysen zur Verfügung gestellt.

Die Konzentration und Integrität der genomischen DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt. Hierfür wurde 1 % Agarose (Agarose GTQ, Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1x TAE gegossen. Zwei µl der DNA wurden zusammen mit 2 µl Ladepuffer (6x BPB) und 8 µl H₂O aufgetragen. Als Vergleich diente lambda-DNA in definierten Massen. Die Gelelektrophorese der DNA erfolgte in einer Elektrophoresekammer (Sub-Cell® GT; BIO-RAD, München, Deutschland) in 1x TAE-Puffer bei einer Gleichspannung von 40 V für etwa 1 h. Anschließend wurde das Gel für 30 min in 0,5 mg Ethidiumbromid/l 1x TAE-Puffer geschüttelt. Es folgte ein Waschgang in H₂O für 15 min. Die DNA wurde unter UV-Licht auf einem Transilluminator (GeneGenius, Syngene, Canbridge, England) sichtbar gemacht und fotografiert.

Für die molekularen Untersuchungen wurden je Elternlinie der HYBRO die isolierte DNA von 4 Einzelpflanzen zu gleichen Anteilen miteinander gemischt. Die Polleneltern

LP01 - LP32 der KWS Lochow wurden jeweils zu einer Mischprobe aus 8 Einzelpflanzen vereint, während die Saateltern-DNA von LP37 - LP40 jeweils aus 6 Genotypen zusammengesetzt wurde. Die Festlegung der jeweiligen Anzahl der Einzelpflanzen in einem Bulk erfolgte durch die Züchter. Sie schätzten hierfür den Heterozygotiegrad ihres Materials ein.

2.3.2 SSR-Analyse

Im Rahmen der Mikrosatelliten-Analyse wurden genomische und EST (Expressed Sequence Tag)-Marker verwendet. Die Genotypisierung der Inzuchtlinien der HYBRO konnte nach dem Protokoll von Hackauf und Wehling (2002a) im Julius Kühn-Institut in Groß Lüsewitz (Deutschland) durchgeführt werden. Es wurden insgesamt 252 SSR-Marker getestet, von denen 243 aus den Entwicklungsvorhaben „SSR-Club“ bzw. GABI (Genomanalyse im biologischen System Pflanze) (SCM (*Secale cereale* Mikrosatelliten)-Primer = EST-Marker) sowie 9 von der KWS Lochow (RMS (Roggenmikrosatelliten)-Marker = genomische Marker) stammen.

In einem 10 µl Ansatz bestehend aus 1x PCR (Polymerasekettenreaktion)-Puffer (1,5 mM MgCl₂, Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, pH 8,7; Qiagen, Hilden, Deutschland), 0,6 mM dNTPs (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,15 µM M13-Primer (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3', IRD700-, IRD800-markiert; Metabion GmbH, Martinsried, Deutschland), 0,5 µM Forward-Primer (mit der Sequenz des M13-Primers, MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland), 2,5 µM Reverse-Primer (MWG-Biotech AG), 0,25 U Hot Star *Taq*-Polymerase (Qiagen), 2,5 mM MgCl₂ (Qiagen) und 1x Q-Solution (Qiagen) wurden 40 ng Matrizen-DNA amplifiziert. Die Aktivierung der Polymerase wurde durch 15 min bei 95°C realisiert. Anschließend erfolgte eine Denaturierung für 45 s bei 95°C und 5 min Annealing bei 68°C. Bei den darauf folgenden 4 Zyklen wurde die Annealingtemperatur jeweils um 2°C gesenkt. Anschließend wurden 45 s für eine Elongation bei 72°C genutzt. In weiteren 5 Zyklen erfolgten jeweils 45 s Denaturierung bei 95°C und bei einer Annealingzeit von 45 s wurde die Temperatur jeweils um 2°C von 58 auf 48°C gesenkt. Nach einer Elongation von 1 min bei 72°C folgten 35 Zyklen mit jeweils 45 s Denaturierung bei 95°C, 1 min 15 s Annealing bei 47°C und 1 min bei 72°C. Der PCR-Ansatz wurde nach einer abschließenden 10-minütigen Extensionsphase bei 72°C auf 10°C gekühlt. Alle

Reaktionen wurden in einem Thermocycler (UNO-Thermoblock, Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Nach Durchführung der PCR wurden dem Amplifikationsprodukt 5 µl des Licor-Ladepuffers zugeführt, das Gemisch für 5 min im Thermocycler bei 72 °C denaturiert und im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Für die Darstellung der Mikrosatelliten-Fragmente wurden Acrylamid-Gel-Elektrophoresen auf einem LI-COR 4300 DNA Analyzer mit Doppellasersystem (700 nm, 800 nm) durchgeführt. Es wurden 14 ml einer 6,5-prozentigen Fertiggellösung (Gel Matrix KB^{Plus}, LI-COR Biosciences GmbH) mit 10,5 µl TEMED und 105 µl 10x APS gemischt. Die Lösung wurde zwischen zwei in einer Halterung befindliche Glasplatten gegossen, die zuvor sorgfältig mit Wasser und Isopropanol gereinigt wurden. Es wurde ein Kamm (96 Taschen; 0,25 mm) in die Apparatur gesteckt, der nach ca. 60 min Polymerisation wieder entfernt werden konnte. Das Gel wurde in die entsprechende Gelkammer des Gerätes gehängt und das Pufferreservoir vorsichtig mit 1x TBE gefüllt. Die entstandenen Taschen wurden, um eventuelle Luftblasen zu entfernen, gespült und die mit Ladepuffer versetzten Proben mit einer Hamilton-Pipette auf das Gel aufgetragen. Als Standard wurden 0,4 µl eines 50-350 bp Größenstandards (IRD700- und IRD800-markiert; LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland) verwendet. Die elektrophoretische Trennung erfolgte für 50 min bei 1500 V, 40 mA, 40 W und 50°C. Fragmentgrößen wurden mit Hilfe der SAGATM Generation 2 Software (LI-COR Biosciences GmbH) ermittelt. Die Auswertung der Gele erfolgte dominant und die An- und Abwesenheit der jeweils amplifizierten Fragmente wurde für die untersuchten Genotypen in einem 1/0-Datensatz dokumentiert (1 = Fragment vorhanden; 0 = Fragment abwesend).

Die Inzuchtlinien der KWS Lochow wurden in einem betriebseigenen Labor der KWS mit 133 SSR-Markern untersucht (22 genomische und 111 EST-SSRs). Dabei kamen ebenfalls SCM- und RMS-, aber auch REMS (Rye Expressed Microsatellite Sites) - Marker zur Anwendung. REMS-Mikrosatelliten sind aus den EST-Sequenzen abgeleitet, die bereits zur Entwicklung von SCM-Markern verwendet wurden (Khlestkina et al., 2004).

Die KWS Lochow hat der Universität Halle die gewonnenen Daten als 1/0-Matrix für die Assoziationsstudie zur Verfügung gestellt.

2.3.3 AFLP-Analyse

Für die AFLP-Analysen wurden 16 *PstI-MseI* und 40 *EcoRI-MseI* Primerkombinationen zufällig ausgewählt (Tabelle 1). Verwendete Oligonukleotide und Adapter wurden von der Firma Operon Biotechnologies GmbH (Köln, Deutschland) synthetisiert. Die Analysen erfolgten in Anlehnung an das Protokoll von Vos et al. (1995). Zunächst wurden je Roggenlinie 500 ng genomische DNA in einem 40 µl-Ansatz bestehend aus 5 U *PstI* bzw. *EcoRI*, 5 U *MseI* und 1x AFLP-Reaktionspuffer für 2½ h bei 37°C inkubiert. Für die Ligation wurden Adapter hergestellt, deren Sequenzen bei Vos et al. (1995) und Hawthorne (2001) entnommen wurden (Tabelle 2). Bei *PstI* bzw. *EcoRI* wurden jeweils 5 pmol beider Stränge mit 1x AFLP-Reaktionspuffer vermischt, für 5 min bei 90°C inkubiert, anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Für den *MseI*-Adapter wurden 25 pmol der beiden Stränge benötigt.

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten AFLP-Primerkombinationen

Primerkombination	<i>PstI</i> Primer (5' → 3')	<i>MseI</i> Primer (5' → 3')
P12/M47	P00 ¹ + GAC	M00 ² + CAA
P12/M48	P00 + GAC	M00 + CAC
P12/M49	P00 + GAC	M00 + CAG
P12/M50	P00 + GAC	M00 + CAT
P12/M51	P00 + GAC	M00 + CCA
P12/M52	P00 + GAC	M00 + CCC
P12/M53	P00 + GAC	M00 + CCG
P12/M54	P00 + GAC	M00 + CCT
P12/M55	P00 + GAC	M00 + CGA
P12/M56	P00 + GAC	M00 + CGC
P12/M57	P00 + GAC	M00 + CGG
P12/M58	P00 + GAC	M00 + CGT
P12/M59	P00 + GAC	M00 + CTA
P12/M61	P00 + GAC	M00 + CTG
P12/M62	P00 + GAC	M00 + CTT
P17/M57	P00 + GCG	M00 + CGG
¹ P00 5'-GACTGCGTACATGCA-3' ² M00 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'		

Fortsetzung Tabelle 1

Primerkombination	<i>EcoRI</i> Primer (5' → 3')	<i>MseI</i> Primer (5' → 3')
E31/M47	E00 ³ + AAA	M00 + CAA
E31/M50	E00 + AAA	M00 + CAT
E31/M57	E00 + AAA	M00 + CGG
E32/M47	E00 + AAC	M00 + CAA
E32/M49	E00 + AAC	M00 + CAG
E32/M52	E00 + AAC	M00 + CCC
E32/M61	E00 + AAC	M00 + CTG
E34/M55	E00 + AAT	M00 + CGA
E34/M58	E00 + AAT	M00 + CGT
E34/M61	E00 + AAT	M00 + CTG
E35/M57	E00 + ACA	M00 + CGG
E35/M61	E00 + ACA	M00 + CTG
E36/M48	E00 + ACC	M00 + CAC
E36/M49	E00 + ACC	M00 + CAG
E36/M56	E00 + ACC	M00 + CGC
E36/M57	E00 + ACC	M00 + CGG
E36/M59	E00 + ACC	M00 + CTA
E36/M60	E00 + ACC	M00 + CTC
E36/M61	E00 + ACC	M00 + CTG
E36/M62	E00 + ACC	M00 + CTT
E37/M47	E00 + ACG	M00 + CAA
E37/M48	E00 + ACG	M00 + CAC
E37/M49	E00 + ACG	M00 + CAG
E37/M50	E00 + ACG	M00 + CAT
E37/M53	E00 + ACG	M00 + CCG
E38/M53	E00 + ACT	M00 + CCG
E40/M47	E00 + AGC	M00 + CAA
E40/M56	E00 + AGC	M00 + CGC
E41/M49	E00 + AGG	M00 + CAG
E41/M53	E00 + AGG	M00 + CCG
E41/M57	E00 + AGG	M00 + CGG
E41/M61	E00 + AGG	M00 + CTG
E42/M47	E00 + AGT	M00 + CAA
E42/M54	E00 + AGT	M00 + CCT
E42/M56	E00 + AGT	M00 + CGC
E42/M57	E00 + AGT	M00 + CGG
E42/M58	E00 + AGT	M00 + CGT
E42/M60	E00 + AGT	M00 + CTC
E42/M62	E00 + AGT	M00 + CTT
E46/M62	E00 + ATT	M00 + CTT
³ E00 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'		

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten AFLP-Adapter (F = Forward; R = Reverse)

Adapter		Sequenz (5' → 3')
<i>Pst</i> I-adapter	F	CTCGTAGACTGCCGTACATGCA
	R	TGTACGCAGTCTAC
<i>Eco</i> RI-adapter	F	CTCGTAGACTGCGTACC
	R	AATTGGTACGCAGTCTAC
<i>Mse</i> I-adapter	F	GACGATGAGTCCTGAG
	R	TACTCAGGACTCAT

Je Ligationsansatz wurden zum DNA-Verdau 5 pmol *Pst*I- bzw. *Eco*RI-Adapter, 50 pmol *Mse*I-Adapter, 1 U T4-DNA-Ligase, 1 mM ATP und 1x AFLP-Reaktionspuffer zugegeben. Die Proben wurden für weitere 4½ h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit 450 µl TE (8,0) verdünnt. Um die Anzahl der entstandenen Fragmente zu verringern wurden in der anschließenden Präamplifikation nur diejenigen mit Adapter ligierten Fragmente amplifiziert, deren Sequenz auf einen um eine Base verlängerten Primer passt. Der 25 µl-PCR-Ansatz bestand aus 2,5 µl der Ligation, 1x PCR-Puffer, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM Forward-Primer (P00 bzw. E00, markiert mit Cy5; Sigma-Genosys, München, Deutschland; Tabelle 1), 0,2 µM Reverse-Primer (M00, Sigma-Genosys; Tabelle 1) und 0,5 U *Taq*-Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland). Einem Denaturierungsschritt von 1 min bei 94°C folgten 20 Zyklen mit je 30 s bei 94°C, 1 min Annealing bei 56°C und 1 min Elongation bei 72°C in einem Thermocycler (MJ Research, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland). Die Präamplifikationsreaktion wurde 1:10 mit H₂O Milli-Q verdünnt. Die *Pst*I- und *Eco*RI-Primer waren Cy5-markiert und eine Amplifikation mit drei selektiven Nukleotiden an beiden *Pst*I- und *Mse*I-Primern wurde durchgeführt mit einem ersten Schritt bei 94°C für 15 min und einem Zyklus bei 94°C für 30 s, 65°C für 30 s und 72°C für 1 min. Bei den darauf folgenden 12 Zyklen wurde die Annealingtemperatur jeweils um 0,7°C von 65°C auf 56°C abgesenkt. Es folgten 23 Zyklen bei 94°C für 30 s, 56°C für 30 s und 72°C für 1 min, gefolgt von 72°C für 2 min.

Die beiden Glasplatten einer Gelelektrophorese-Apparatur wurden gründlich mit H₂O Milli-Q und anschließend mit 70-prozentigem Isopropanol gereinigt. Auf den oberen

Rand der Innenseite der Glasplatte wurde ein Gemisch aus 80 µl Bindesilan und 20 µl 10-prozentiger Essigsäure verteilt. Anschließend wurde ein weiteres Mal mit isopropanolgetränkten Fasertüchern geputzt. Damit war gewährleistet, dass die Platteninnenseite trocken und frei von Staub ist. Die Spacer (0,5 mm) wurden ebenfalls mit H₂O und Isopropanol gereinigt und in die vorgegebene Position gebracht. Die zweite Platte wurde mit entsprechenden Klammern auf der Apparatur fixiert. 40 ml SequaGel®-6 Lösung (National Diagnostics, Atlanta, USA) wurden mit 400 µl 10-prozentiger APS-Lösung und 10 ml SequaGel Complete Lösung (National Diagnostics) zwischen die Platten gegossen und der Kamm (0,5 mm) eingesetzt. Nach ca. 2 Stunden Polymerisationszeit wurde die Apparatur in einen ALF Express eingebaut, mit 0,5x TBE als Laufpuffer aufgefüllt, auf 50°C vorgeheizt und der Kamm entfernt. Es wurden 3 µl PCR-Produkt mit 3 µl des AFLP-Fillers versetzt. Das Gemisch wurde für 1½ min bei 90°C denaturiert und auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte auf einem ALFexpress™ DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) für 600 min bei 1500 V, 60 mA, 25 W, 50°C und einer Samplingzeit von 2 s. Allelgrößen wurden mit Hilfe der ALFwin™ fragment analyser software v1.03 (Amersham Pharmacia Biotech) ermittelt. Die Auswertung erfolgte dominant, d. h. nach An- bzw. Abwesenheit der entsprechenden Banden. Für die Datenanalyse wurde eine 1/0-Matrix erstellt, wobei 1 für die Anwesenheit und 0 für die Abwesenheit einer Bande steht.

2.3.4 Entwicklung von PCR-Primern für Kandidatengene der Stärkebiosynthese

Primerdesign

Weitere Arbeiten beschäftigten sich mit der Entwicklung von Primern für Gene der Stärkebiosynthese aus Roggen und verwandten Arten. Geeignete Sequenzen wurden in der NCBI (National Center for Biotechnology Information) -Datenbank gesucht. Es interessierten Genbereiche, die für Enzyme des Stärkemetabolismus kodieren. Da für Roggen bisher nur wenige Informationen vorlagen, wurden vor allem Sequenzen anderer Getreidearten zur Primerentwicklung genutzt. Im Abschnitt 3.3.3 sind die verwendeten Genbankakzessionen gemeinsam mit erzielten Ergebnissen aufgelistet. Es wurden konservierte Bereiche ausgewählt, die zuvor mit Hilfe des Programms BioEdit Version 7.0.8.0 (biological sequence alignment editor; Hall, 1999) zwischen den Arten

Gerste, Weizen und Reis dargestellt werden konnten. Die Primerentwicklung erfolgte in den Exonbereichen der Kandidatengene und mit Hilfe des Programms Primer3 (Rozen und Skaletsky, 2000). Die entwickelten Primer wurden von der Firma Operon Biotechnologies GmbH (Köln, Deutschland) synthetisiert.

PCR zur Prüfung der entwickelten Primerpaare

Die aus Stärkegenen entwickelten Primer wurden zunächst mit DNA von Gerste, Weizen, Reis und Roggen auf ihre Funktionsfähigkeit hin getestet. Hierzu wurden 25 ng Matrizen-DNA in einem 25 µl Ansatz bestehend aus 1x PCR-Puffer (1,5 mM MgCl₂, Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, pH 8,7; Qiagen, Hilden, Deutschland), 0,2 mM dNTPs (Roche, Mannheim, Deutschland), 0,3 µM Forward-Primer, 0,3 µM Reverse-Primer, 0,5 U *Taq*-Polymerase (Qiagen) und 1,5 mM MgCl₂ (Qiagen) amplifiziert. Einem Denaturierungsschritt von 3 min bei 94°C folgten in Abhängigkeit vom verwendeten Primerpaar 35, 40 oder 45 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 94°C, 45 s Annealing bei 55, 57 oder 60°C und 45 s Elongation bei 72°C. Nach einer abschließenden Extensionsphase von 8 min bei 72°C wurde der PCR-Ansatz auf 10°C gekühlt. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler (MJ Research, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) durchgeführt. Bei erfolgreicher Amplifikation im Roggen wurden alle 65 Inzuchtlinien von KWS Lochow und HYBRO mit den entsprechenden Primern auf Polymorphismen untersucht.

Darstellung von PCR-Produkten

Es wurden Gele aus 2 % Agarose (FMC® Agarose; FMC BioProducts, Rockland, USA) in 1x TBE-Puffer verwendet. 5 µl PCR-Produkt, 5 µl H₂O und 2 µl 6x BPB wurden zusammen mit einem Größenmarker (GeneRuler™, 100bp DNA Ladder; MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) zur Bestimmung der Fragmentgrößen aufgetragen. Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte erfolgte in einer Elektrophoresekammer (Sub-Cell® GT; BIO-RAD, München, Deutschland) in 1x TBE-Puffer bei einer Gleichspannung von 5,5 V/cm Gel für etwa 2 h. Anschließend wurde das Gel für 30 min in 0,5 mg Ethidiumbromid/l 1x TAE-Puffer geschüttelt. Es folgte ein

Waschgang in H₂O für 15 min. Die PCR-Fragmente konnten anschließend unter UV-Licht auf einem Transilluminator (GeneGenius, Syngene, Cambridge, England) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Sequenzierung wurde jeweils das PCR-Produkt einer einzelnen Roggeninzuchtlinie genutzt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers.

Zur Kontrolle wurden 5 µl des gereinigten PCR-Produktes mit 5 µl H₂O und 2 µl 6x BPB gemischt und zusammen mit einem Größenmarker (GeneRuler™, 100bp DNA Ladder; MBI Fermentas) auf ein 2-prozentiges Agarosegel aufgetragen.

Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte mit dem jeweiligen Forward-Primer durch die Firma MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Deutschland).

Sequenzvergleiche

Die Sequenzen der PCR-Fragmente wurden in der NCBI-Datenbank über die Prozedur Blastn auf Übereinstimmung mit Stärkegenen bzw. -genabschnitten anderer Arten geprüft. Für die Beurteilung der Ergebnisse werden der Score und der E-Wert des Sequenzvergleiches betrachtet. Der Score ist eine quantitative Bewertung der Ähnlichkeit mit einer bereits bekannten Sequenz in der Datenbank. Je höher der Wert ist, desto besser ist das Ergebnis zu beurteilen (Hansen, 2004). Der E-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Sequenzalignment vorliegt. Er setzt sich aus der Anzahl der erwarteten Alignments zusammen, die man in einer Datenbank aus Zufallssequenzen finden würde, deren Score größer oder gleich dem tatsächlich

gefundenen ist. Ein hoher Wert deutet an, dass das Alignment womöglich nur ein Zufallstreffer ist und die Sequenzen nichts miteinander zu tun haben.

Verdau von PCR-Produkten

Um eine mögliche Variabilität in der Sequenz der PCR-Produkte aufdecken zu können, wurden sie mit den Restriktionsenzymen *HaeIII*, *HinfI*, *HinP1I*, *RsaI* und *TaqI* (New England BioLabs, Ipswich, England; Tabelle 3) verdaut. Hierfür wurde ein 8 µl-Ansatz bestehend aus 5 µl PCR-Produkt, 1x NE-Puffer, BSA (nur für *TaqI*) und 1 U Enzym bei 37°C bzw. 65°C (*TaqI*) für 2 h verdaut. Die Darstellung erfolgte erneut auf Agarosegelen und wurde nach An- bzw. Abwesenheit der erzeugten Fragmente ausgewertet.

Tabelle 3: Verwendete Restriktionsenzyme, ihre Erkennungssequenzen und Schnittstellen

Enzym	Erkennungssequenz	Schnittstelle
<i>HaeIII</i>	GGCC	GG/CC CC/GG
<i>HinfI</i>	GANTC	G/ANTC CTNA/G
<i>HinP1I</i>	GCGC	G/CGC CGC/G
<i>RsaI</i>	GTAC	GT/AC CA/TG
<i>TaqI</i>	TCGA	T/CGA AGC/T

2.4 Datenanalyse

Auswertung der Feldversuche

Die Feldversuche wurden jeweils mit dem Statistikprogramm SAS (SAS Institute Inc., 2002-2003) und der PROC GLM Prozedur varianzanalytisch ausgewertet.

Die Heritabilität h^2 wurde wie folgt berechnet:

$$h^2 = \frac{MQ_G - MQ_{GU} - MQ_{GT} + MQ_{Rest}}{MQ_G}$$

MQ_G ...Mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Genotypen

MQ_{GU} ...Mittleres Abweichungsquadrat zwischen Genotyp und Umwelt

MQ_{GT} ...Mittleres Abweichungsquadrat zwischen Genotyp und Tester

MQ_{REST} ...Mittlers Abweichungsquadrat Rest

Korrelationskoeffizienten wurden nach Pearson mit der PROC CORR Prozedur von SAS berechnet.

Berechnung der genetischen Diversität

Die aus der AFLP- und SSR-Analyse hervorgegangenen Datensätze wurden zur Berechnung genetischer Distanzen (Nei, 1972) zwischen den Roggeninzuchtlinien verwendet und eine UPGMA-Clusteranalyse (unweighted pair group method with the arithmetic average) mit dem Programm NTSYSpc Version 2.11s (Rohlf, 1998) durchgeführt.

Anschließend wurden die Distanzmatrizen, basierend auf den beiden Markerdatensätzen, jeweils für das Versuchsmaterial der KWS Lochow und HYBRO über einen Mantel-Test (Mantel, 1967) miteinander verglichen (250 Permutationen).

Assoziationsstudie

Für die Assoziationsstudie wurden die molekularen Daten der 32 Polleneltern der KWS Lochow und der 23 Saateltern der HYBRO sowie die phänotypischen Merkmale der entsprechenden Hybriden getrennt nach Züchtermaterial in einem Datensatz integriert. Der t-Test wurde mit der PROC TTest Prozedur von SAS berechnet. Dabei wurde für jedes Merkmal und jeden Marker geprüft, ob sich für die beiden Klassen eines Markers (Fragmentan- und -abwesenheit) das Merkmal unterscheidet. Die Signifikanzgrenze wurde auf $P=0.01$ gesetzt. Es wurden nur die Marker verwendet, bei denen die schwächer besetzte Klasse mindestens 4 Individuen aufwies.

Das Bestimmtheitsmaß (R^2) und die Korrelationskoeffizienten (r) wurden nach Pearson mit der PROC CORR Prozedur von SAS zwischen den jeweiligen Markern und den Merkmalen berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Kalibrierungspopulation

Ausgangspunkt war die Erfassung der genetischen Variabilität im Roggen hinsichtlich der für die Bioethanolproduktion relevanten Merkmale. Es wurde eine Kollektion, bestehend aus 102 Roggenlinien und -sorten, zusammengestellt, die auch für die Kalibrierung von Nahinfrarot-Spektroskopen genutzt wurde.

Erste Ergebnisse der NIT- und der Saatkornanalyse der untersuchten Genotypen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Das mittlere Hektolitergewicht war 76,2 kg/100 l mit einem Minimum und einem Maximum von 65,6 und 82,6 kg/100 l bei den Genotypen R89 und R55. Für R98 und R71 wurden mit 22,7 und 46,8 g die niedrigste und höchste Tausendkornmasse analysiert, mit einem Mittel von 36,7 g. Die Roggenlinien und -sorten der HYBRO (R88 - R102) zeigten den geringsten Ertrag mit einem durchschnittlichen Hektolitergewicht von 70,6 kg/100 l und einer mittleren TKM von 28,3 g. Für das Zuchtmaterial der Professur für Pflanzenzüchtung (R37 - R72) konnten die höchsten mittleren Ertragswerte ermittelt werden. Die Protein- und Stärkegehalte wurden mittels Nahinfrarottransmissions-Analyse (InfratecTM 1241) bei der MBE in Zörbig ermittelt. Der höchste mittlere Stärkegehalt war 56,8 % beim Zuchtmaterial der Professur für Pflanzenzüchtung (R37 - R72). Für die Linien R89 und R53 schwankte der Stärkegehalt zwischen 49,9 und 60,1 %.

Eine große Variation bezüglich des Proteingehalts konnte innerhalb der Roggenkollektion ermittelt werden. Der mittlere Proteingehalt in der Trockenmasse betrug 11,6 %. Für die Roggenlinien R85 und R89 wurde der niedrigste und höchste Proteingehalt mit 7,8 und 15,5 % beobachtet. Den geringsten mittleren Proteingehalt hatten die Roggengenotypen der KWS Lochow (R73 - R87) mit 8,9 %. Die Zuchtlinie R89 von der HYBRO mit dem niedrigsten Hektolitergewicht (65,5 kg/100 l) und dem niedrigsten Stärkegehalt (49,9 %) wies den höchsten Proteingehalt auf (15,5 %).

Mit der MARVIN-Saatkornanalyse wurden am IPK in Gatersleben von 2 x 100 Roggenkörnern die durchschnittliche Länge, Breite und Fläche ermittelt. Die Breite der Roggenkörner variierte zwischen 2,3 mm (R52, R96) und 3,1 mm (R64) mit einer durchschnittlichen Breite von 2,7 mm. Für die Genbankakzession R11 konnte mit 6,1 mm die geringste Länge ermittelt werden. Die Körner der Linien R71 und R95 waren mit 8,3 mm am längsten. Im Durchschnitt wurde eine Länge von 7,2 mm beobachtet.

Die Fläche der Körner schwankte zwischen 14,8 und 22,7 mm² für die Linien R98 und R71 mit einem Mittel von 18,9 mm².

Die Korrelationskoeffizienten zwischen den Merkmalen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Dabei bestätigen die Ergebnisse bekannte Zusammenhänge, wie die negative Korrelation zwischen Protein- und Stärkegehalt sowie die positive Korrelation zwischen TKM und hl-Gewicht und zwischen Stärkegehalt und TKM sowie hl-Gewicht. Eine positive Korrelation konnte für die Kornmerkmale und die TKM gefunden werden. Die Breite der Körner ist signifikant negativ korreliert mit dem Stärkegehalt.

Tabelle 4: Mittel-, Minimum- und Maximumwerte ausgewählter Merkmale für die Roggenkollektion

	Ertragskomponenten		Infratec Analyser		MARVIN Saatkornanalyse		
	TKM (g)	hl-Gewicht (kg/100 l)	Stärke- gehalt (%)	Protein- gehalt (%)	Breite (mm)	Länge (mm)	Fläche (mm ²)
Gesamt- mittel	36,7	76,2	55,1	11,6	2,7	7,2	18,9
Genbankakkzessionen (R1 - R36)							
Mittel	36,4	76,4	53,5	13,0	2,7	7,1	18,6
Min	26,5	72,3	50,1	10,4	2,5	6,1	14,8
Max	45,2	80,6	56,7	14,6	3,1	7,9	22,2
Zuchtmaterial der Professur für Pflanzenzüchtung (R37 - R72)							
Mittel	40,3	78,2	56,8	10,9	2,8	7,2	19,6
Min	25,5	69,1	54,2	8,8	2,3	6,1	15,1
Max	46,8	82,6	60,1	13,2	3,1	8,3	22,7
KWS Lochow Zuchtmaterial (R73 - R87)							
Mittel	37,0	76,5	56,3	8,9	2,8	7,2	19,0
Min	29,8	73,8	54,8	7,8	2,6	6,5	16,3
Max	42,8	78,5	58,0	9,7	2,9	7,7	20,7
HYBRO Roggenlinien und -sorten (R88 - R102)							
Mittel	28,3	70,6	53,8	12,7	2,6	7,1	17,8
Min	22,7	65,6	49,9	10,2	2,3	6,2	14,8
Max	32,9	75,6	58,6	15,5	2,8	8,3	20,5

Tabelle 5: Korrelationskoeffizienten zwischen den untersuchten Merkmalen der Roggenkollektion

Merkmal	TKM	hl-Gewicht	Stärke- gehalt	Protein- gehalt	Korn- breite	Korn- länge	Korn- fläche
TKM	1	0,48***	0,35***	-0,23*	0,89***	0,57***	0,85***
hl-Gewicht		1	0,55***	-0,33***	0,34***	-0,26**	0,02
Stärkegehalt			1	-0,76***	-0,19*	0,01	-0,09
Proteingehalt				1	0,25**	-0,06	0,12
Kornbreite					1	0,45***	0,80***
Kornlänge						1	0,88***
Kornfläche							1

*, **, *** signifikant bei P = 0.05, P = 0.01, und P = 0.001.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der nasschemischen Analysen dargestellt, wobei Stärke-, Protein-, löslicher Pentosan- und Gesamtpentosangehalt sowie die Wasserextraktviskosität (WEV) untersucht wurden.

Der durchschnittliche Stärkegehalt betrug 61,9 % mit einem Minimum und Maximum von 49,5 (R89) und 67,5 % (R85).

Der niedrigste und höchste Proteingehalt lag bei 6,4 und 15,4 % (R85 und R89). Im Durchschnitt betrug der Proteingehalt 10,9 %. Die Roggenlinie R89 von der HYBRO bestätigte damit die Ergebnisse der NIT-Analyse.

Für die löslichen Pentosane konnte ein durchschnittlicher Gehalt von 2,2 % ermittelt werden. Minimum und Maximum lagen bei 1,2 (R54) und 5,5 % (R90). Der Gesamtpentosangehalt lag im Mittel bei 9,3 % mit einem Minimum und Maximum von 7,3 (R20) und 14,3 % (R93). Die Roggenlinie R90 zeigte die höchste Wasserextraktviskosität (31,7 mPa.s). Der minimale Wert lag bei 2,6 mPa.s mit einem durchschnittlichen Wert von 6,0 mPa.s.

Tabelle 6: Mittel-, Minimum- und Maximumwerte der nasschemischen Analyse für ausgewählte Merkmale der Roggenkollektion

	Stärkegehalt (%)	Proteingehalt (%)	löslicher Pentosangehalt (%)	Gesamtpentosan- gehalt (%)	Wasserextrakt- viskosität (mPa.s)
Mittel	61,9	10,9	2,2	9,3	6,0
Genbankakkzessionen (R1 - R36)					
Mittel	60,7	12,4	2,1	9,1	5,5
Min	55,5	9,8	1,6	7,3	3,5
Max	65,2	14,6	3,0	11,7	9,8
Zuchtmaterial der Professur für Pflanzenzüchtung (R37 - R72)					
Mittel	63,6	10,0	1,8	8,9	5,5
Min	60,7	7,7	1,2	7,6	2,6
Max	66,4	13,0	2,5	11,6	12,0
KWS Lochow Roggenlinien und -sorten (R73 - R87)					
Mittel	65,4	7,6	1,9	9,1	4,7
Min	63,6	6,4	1,5	7,8	3,2
Max	67,5	8,8	2,2	10,8	6,0
HYBRO Roggenlinien und -sorten (R88 - R102)					
Mittel	57,4	12,3	3,4	10,6	9,6
Min	49,5	9,8	2,1	7,9	2,8
Max	62,7	15,4	5,5	14,3	31,7

Ein Vergleich der Ergebnisse der NIT- und der nasschemischen (NCA) Analyse ist hinsichtlich des Stärke- und Proteingehaltes möglich. Die Spanne zwischen dem niedrigsten und höchsten Wert ist für beide Merkmale bei der nasschemischen Analyse höher. Sie beträgt 18,0 bzw. 9,0 % für den Stärke- und Proteingehalt. Im Gegensatz dazu konnte mit den Ergebnissen der NIT-Analyse eine Differenz von 10,2 bzw. 7,7 % für den Stärke- und Proteingehalt ermittelt werden. Die gleichen Roggenlinien wiesen den geringsten (R85) und höchsten (R89) Proteingehalt in beiden Untersuchungen auf. Beim Stärkegehalt war dies nicht der Fall. Die Linie R89 hatte in beiden Analysen den niedrigsten Stärkegehalt (NIT: 49,9 %; NCA: 49,5 %). Den höchsten Stärkegehalt in der NIT-Analyse (Tabelle 3) hatte R53 mit 60,1 %, während diese Linie in der nasschemischen Untersuchung einen Stärkegehalt von 64,5 % (Platz 24 von 102 analysierten Roggenentypen) hatte. R85 zeigte in der nasschemischen Analyse den

höchsten Stärkegehalt (67,5 %), während mit NIT lediglich 58,0 % ermittelt worden. Das ist Platz 10 unter 102 analysierten Roggengenotypen.

Die Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 7 dargestellt. Die signifikant negative Korrelation zwischen Stärke- und Proteingehalt wurde bestätigt. Beim Proteingehalt korrelieren die Ergebnisse der beiden Methoden (NIT- und nasschemische Analyse) stark positiv. Eine ebenfalls signifikant positive Korrelation konnte für die Stärkegehalte ermittelt werden, allerdings ist diese deutlich niedriger.

Es existiert eine starke positive Korrelation zwischen dem löslichen Pentosangehalt sowie dem Gesamtpentosangehalt und der Wasserextraktviskosität. Der lösliche Pentosangehalt ist positiv mit dem Proteingehalt und negativ mit dem Stärkegehalt korreliert, unabhängig davon, welche Methode zur Bestimmung verwendet wurde.

Tabelle 7: Korrelationskoeffizienten zwischen Merkmalen, die mit beiden Methoden (NIT und nasschemisch (NCA)) analysiert wurden

Merkmal	Protein- gehalt (NIT)	Stärke- gehalt (NIT)	Protein- gehalt (NCA)	Stärke- gehalt (NCA)	löslicher Pentosan- gehalt (NCA)	Gesamt- pentosan- gehalt (NCA)	WEV (NCA)
Protein- gehalt (NIT)	1	-0,76***	0,98***	-0,43***	0,19*	0,04	0,04
Stärke- gehalt (NIT)		1	-0,74***	0,72***	-0,35***	-0,19*	-0,19*
Protein- gehalt (NCA)			1	-0,45***	0,20*	0,05	0,05
Stärke- gehalt (NCA)				1	-0,16	-0,31**	-0,08
löslicher Pentosan- gehalt (NCA)					1	0,80***	0,80***
Gesamt- pentosan- gehalt (NCA)						1	0,43***
WEV (NCA)							1

*, **, *** signifikant bei P = 0.05, P = 0.01, und P = 0.001.

Entwicklung von Kalibrierungskurven

Die erhobenen Daten der zusammengestellten Roggenkollektion konnten für die Entwicklung von Kalibrierungskurven zur Bestimmung von Stärke-, Protein- und Pentosengehalt mittels NIT- bzw. NIR-Analyse genutzt werden. Daraus resultierende Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

Ergebnisse für das Infratec-Gerät

Bei der Validierung der Kalibrierung des Infratec-Gerätes lagen die erreichten Genauigkeiten bei einem Standardfehler von 0,76; 0,60 und 1,40 %-Punkten Protein, Pentosan und Stärke (Tabelle 8). Für den Protein- und Stärkegehalt konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,95 bzw. 0,92 ermittelt werden. Bei der Pentosan-Analytik wurde lediglich ein maximaler Wert von 0,60 erreicht.

Tabelle 8: Ergebnisse der Validierung für das Infratec-Gerät

Merkmal	n	SEP	SEP (C)	Bias	r
Protein	34	0,77	0,76	-0,06	0,95
Pentosan	34	0,61	0,60	-0,05	0,60
Stärke	34	1,41	1,40	0,27	0,92

n...Anzahl Proben

SEP...Standardschätzfehler der Kalibrierung

SEP (C)...Standardschätzfehler um Bias korrigiert

Bias...systematischer Fehler

r...Korrelationskoeffizient zwischen den Ergebnissen der Referenzmethode und den aus den Reflektionsspektren ermittelten Werten

Ergebnisse für das NIRSystems-Gerät

Die Ergebnisse der Validierung auf dem NIRSystems-Gerät sind für die betrachteten Merkmale in Tabelle 9 dargestellt. Nach Korrektur der Daten um den Bias liegen die erreichten Genauigkeiten bei einem Standardfehler von 0,30; 0,43 und 1,19 %-Punkten Protein, Pentosan und Stärke.

Die ermittelten Korrelationskoeffizienten waren mit 0,92 und 0,95 für den Protein- und Stärkegehalt sehr hoch. Bei dem Pentosengehalt wurde ein Koeffizient von $r = 0,71$ berechnet.

Damit konnte über das NIRSystem ein höheres Bestimmtheitsmaß für den Pentosengehalt erzielt werden als bei der Infratec-Analyse. Es wurden aber beide Ergebnisse für dieses Merkmal als unzureichend bewertet, so dass eine Analyse des Pentosengehaltes der Einzelhybriden beider Züchter unterblieb.

Tabelle 9: Ergebnisse der Validierung für das NIRSystems-Gerät

Merkmal	n	SEP	SEP (C)	Bias	r
Protein	34	0,31	0,30	-0,06	0,92
Pentosan	34	0,43	0,43	-0,04	0,71
Stärke	34	1,17	1,19	-0,01	0,95

n...Anzahl Proben

SEP...Standardschätzfehler der Kalibrierung

SEP (C)...Standardschätzfehler um Bias korrigiert

Bias...systematischer Fehler

r...Korrelationskoeffizient zwischen den Ergebnissen der Referenzmethode und den aus den Reflektionsspektren ermittelten Werten

3.2 Untersuchung der Hybridkombinationen

3.2.1 Ergebnisse der KWS Lochow

Wichtige Merkmale des Roggens als Rohstoff für die Bioethanolproduktion wurden im Erntejahr 2005 an 6 Standorten für $4 \times 32 = 128$ Hybriden der KWS Lochow erfasst. Eine Zusammenfassung der Versuchsergebnisse ist in Tabelle 10 dargestellt.

Im Mittel über alle Standorte und Versuchswiederholungen konnte ein Stärkegehalt von 65,6 % für die Hybriden erfasst werden. Der niedrigste und höchste mittlere Stärkegehalt lagen bei 63,8 und 66,9 %. Die Spannweite betrug dementsprechend 3,1 %. Der Proteingehalt lag im Mittel bei 9,6 %. Durchschnittlich wurde ein Kornertrag von 90,2 dt/ha für die KWS Lochow-Hybriden erfasst. Das Hektolitergewicht und die Tausendkornmasse lagen im Mittel bei 76,1 kg/100 l und 37 g. Die Wuchshöhe betrug im Durchschnitt aller Hybriden 126,2 cm.

Tabelle 10: Mittelwert, Minimum und Maximum für die wichtigsten Merkmale der KWS Lochow-Hybriden im Erntejahr 2005 (gemittelt über alle Saatektern, 6 Standorte und 2 Wiederholungen)

Merkmal	Mittel	Min	Max
Stärkegehalt (%)	65,6	63,8	66,9
Proteingehalt (%)	9,6	9,1	10,1
Kornertrag (dt/ha)	90,2	86,7	93,9
Stärkeertrag (dt/ha)	59,3	56,8	61,9
hl-Gewicht (kg/100 l)	76,1	74,4	78,1
Tausendkornmasse (g)	37,0	33,5	40,4
Pflanzenhöhe (cm)	126,2	120,8	132,0

Das Statistikprogramm SAS wurde verwendet, um eine Varianzanalyse mit den Versuchsdaten der KWS Lochow durchzuführen. Die Ergebnisse sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Es konnten signifikante Unterschiede der einzelnen Hybriden bzw. Polleneltern hinsichtlich aller erfassten Merkmale berechnet werden. Die Polleneltern x Umwelt Interaktion war ebenfalls für alle Merkmale signifikant.

Bei Betrachtung von Pollen- und Saateltern wird deutlich, dass deren Interaktion die Ausprägung der Merkmale Stärkegehalt, Kornertrag, Stärkeertrag, hl-Gewicht, Tausendkornmasse und Pflanzenhöhe signifikant beeinflusste.

Aus den MQ-Werten konnten die Heritabilitäten geschätzt werden. Die meist hohen Werte zeigten, dass die relevanten Merkmale züchterisch gut zu bearbeiten sind. Für den Stärke- und Proteingehalt wurden Heritabilitäten von 86 und 81 % berechnet. Die Werte des Korn- sowie Stärkeertrags waren mit 28 bzw. 52 % vergleichsweise gering. Für das hl-Gewicht sowie die Tausendkornmasse wurden die höchsten Heritabilitätswerte beobachtet.

Tabelle 11: Varianztabelle und Heritabilitäten (h^2) für die Merkmale der Hybriden der KWS Lochow im Erntejahr 2005 (PE = Pollenelter, SE = Saaterter = Tester, FG = Freiheitsgrad, MQ = Mittleres Abweichungsquadrat)

Merkmal	PE		PE x Umwelt		PE x SE		Fehler		Heritabilität h^2
	FG	MQ	FG	MQ	FG	MQ	FG	MQ	
Stärkegehalt	31	11,85***	155	1,24***	93	1,19***	461	0,73	86
Proteingehalt	31	1,36***	155	0,24***	93	0,14	461	0,12	81
Kornertrag	31	55,66***	155	36,41***	93	13,82*	454	9,93	28
Stärkeertrag	31	44,23***	155	19,60***	93	7,01*	451	5,21	52
hl-Gewicht	31	28,37***	155	0,65***	93	0,50***	464	0,17	97
Tausendkornmasse	31	45,10***	155	2,54***	93	1,96***	462	0,67	92
Pflanzenhöhe	31	211,75***	155	21,94***	93	13,27***	458	6,35	86

*, **, *** signifikant bei $P = 0.05$, $P = 0.01$, und $P = 0.001$.

In Tabelle 12 sind die Korrelationskoeffizienten der untersuchten Merkmale der Hybriden der KWS Lochow über alle Pollen- und Saateltern sowie Versuchsstandorte dargestellt. Wie bei Betrachtung der Ergebnisse der Roggenkollektion in Abschnitt 3.1 war eine signifikant negative Korrelation des Proteingehaltes mit dem Stärkegehalt bzw. -ertrag und dem Kornertrag auch in diesem Versuch feststellbar. Die Koeffizienten lagen bei -0,74, -0,72 und -0,50. Des Weiteren konnte ein positiver Zusammenhang

zwischen Stärkegehalt und -ertrag mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,70 beobachtet werden.

Tabelle 12: Korrelationskoeffizienten zwischen den untersuchten Merkmalen der Hybriden der KWS Lochow (gemittelt über alle Saateltern, 6 Standorte und 2 Wiederholungen)

Merkmal	Stärke- gehalt	Protein- gehalt	Korn- ertrag	Stärke- ertrag	hl- Gewicht	TKM	Pflanzen- höhe
Stärkegehalt	1	-0,74***	0,31	0,70***	-0,23	0,37	-0,27
Proteingehalt		1	-0,50**	-0,72***	-0,03	-0,05	0,12
Kornertrag			1	0,90***	0,05	-0,08	-0,14
Stärkeertrag				1	-0,07	0,12	-0,24
hl-Gewicht					1	-0,24	0,12
TKM						1	-0,03
Pflanzenhöhe							1

*, **, *** signifikant bei P = 0.05, P = 0.01, und P = 0.001.

Werden die Versuchsergebnisse getrennt nach Standort betrachtet fällt auf, dass der mittlere Korn- und Stärkeertrag mit 54,1 und 31,0 dt/ha in Petkus im Vergleich zum Mittel über die 6 Standorte nur etwa 60 % betragen (Tabelle 13). Für Prislich wurde mit durchschnittlich 104,7 dt/ha der höchste Kornertrag beobachtet. Der Standort Kontratowice lag im Mittel mit 101,3 dt/ha ebenfalls deutlich über dem Durchschnitt und wies zugleich die geringste Wuchshöhe auf. Bei den anderen erfassten Merkmalen gab es nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsstandorten.

Tabelle 13: Mittelwert, Minimum und Maximum für die wichtigsten Merkmale der Hybridkombinationen im Erntejahr 2005 an 6 Standorten der KWS Lochow (gemittelt über alle Saateltern sowie 2 Wiederholungen)

Merkmale		Versuchsstandorte:					
		Bernburg	Falencin	Kontratowice	Petkus	Prislich	Seligenstadt
Stärke- gehalt (%)	Mittel	66,7	66,4	66,1	63,5	65,1	66,2
	Min	64,6	65	63,3	61,2	63,5	64,3
	Max	67,9	68,4	68,7	64,9	66,3	67,9
Protein- gehalt (%)	Mittel	9,7	9,5	9,4	9,6	10	9,2
	Min	9,2	8,7	8,5	9,1	9,4	8,4
	Max	10,4	10,1	10,5	10,3	10,8	10,1
Kornertrag (dt/ha)	Mittel	90,9	94,8	101,3	54,1	104,7	94,9
	Min	84,1	86	94,6	49,8	99,7	88,2
	Max	98,0	104,1	109,4	58,7	111,0	102,6
Stärkeertrag (dt/ha)	Mittel	60,6	63,0	67,0	34,4	68,1	62,9
	Min	55,2	56,1	60,7	30,9	64,3	56,7
	Max	65,7	68,7	72,8	37,8	72,2	68,7
hl-Gewicht (kg/100 l)	Mittel	74,1	76,3	75,1	74,1	76,3	80,3
	Min	71,9	74,9	73,3	72,0	74,7	78,6
	Max	76,8	78,1	77,5	76,0	78,4	82,4
Tausendkorn- masse (g)	Mittel	32,1	41,6	34,4	36,3	36,8	41,6
	Min	27,6	38,5	30,2	33,3	33,7	38,0
	Max	35,5	44,6	39,3	39,9	40,3	44,6
Pflanzen- höhe (cm)	Mittel	138,8	134,1	109,1	116,6	131,7	129,6
	Min	133,0	126,9	101,4	108,4	125,1	123,9
	Max	147,0	141,2	118,5	124,2	138,5	135,4

Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse der Hybridkombinationen getrennt nach den 4 Saateltern der KWS Lochow. Die Verrechnung erfolgte über 6 Versuchsstandorte. Signifikante Unterschiede konnten bei den einzelnen Saateltern für keines der erfassten Merkmale beobachtet werden.

Tabelle 14: Mittelwerte der untersuchten Merkmale der KWS Lochow-Hybriden im Erntejahr 2005 getrennt für die 4 Saateltern (gemittelt über 32 Polleneltern, 6 Standorte und 2 Wiederholungen)

Merkmal	Mittelwerte der Saateltern:			
	LP37	LP38	LP39	LP40
Stärkegehalt (%)	66,0	64,8	65,3	66,6
Proteingehalt (%)	9,4	9,9	9,7	9,3
Kornertrag (dt/ha)	89,9	89,1	92,1	89,4
Stärkeertrag (dt/ha)	59,4	57,9	60,3	59,7
hl-Gewicht (kg/100 l)	76,1	76,3	76,1	75,6
Tausendkornmasse (g)	36,6	36,1	38,3	37,5
Pflanzenhöhe (cm)	124,1	123,6	129,6	129,3

3.2.2 Ergebnisse der HYBRO

Erntejahr 2005

Eine Zusammenfassung der Versuchsergebnisse der HYBRO für das Erntejahr 2005 ist in Tabelle 15 dargestellt. Im Mittel über die untersuchten Versuchsstandorte konnte ein Stärkegehalt von 61,6 % für die Hybriden erfasst werden. Das Minimum und Maximum lagen bei 60,4 und 63,0 %. Dementsprechend betrug die Spannweite im Stärkegehalt 2,6 %. Für den Proteingehalt konnte im Mittel ein Wert von 9,5 % festgestellt werden. Es wurde ein durchschnittlicher Kornertrag von 98,6 dt/ha erfasst. Das Hektolitergewicht und die Tausendkornmasse lagen im Mittel bei 73,8 kg/100 l und 38,3 g. Durchschnittlich wurde eine Fallzahl von 238,1 s beobachtet. Für Braunrost und Mehltau konnte ein gutes Resistenzniveau festgestellt werden. Kornbreite und -länge wurden für das Versuchsmaterial der HYBRO über Marvinanalysen bestimmt. Im Mittel wurden Werte von 3,1 und 7,5 mm erfasst.

Tabelle 15: Mittelwert, Minimum und Maximum für die wichtigsten Merkmale der HYBRO-Hybriden im Erntejahr 2005 (gemittelt über alle Polleneltern, Standorte und 2 Wiederholungen)

Merkmal	Mittel	Min	Max
Stärkegehalt (%)	61,6	60,4	63,0
Proteingehalt (%)	9,5	8,8	10,3
Kornertrag (dt/ha)	98,6	94,7	103,6
Stärkeertrag (dt/ha)	60,7	57,9	64,3
hl-Gewicht (kg/100 l)	73,8	71,5	75,2
Tausendkornmasse (g)	38,3	35,2	41,6
Pflanzenhöhe (cm)	152,5	140,6	160,4
Fallzahl (s)	238,1	191,8	283,2
Braunrost (Bonitur 1-9)	4,2	2,6	5,6
Mehltau (Bonitur 1-9)	2,7	1,8	3,9
Kornbreite (mm)	3,1	2,9	3,2
Kornlänge (mm)	7,5	7,2	7,8

In Tabelle 16 sind die Varianzen für das Versuchsmaterial der HYBRO im Erntejahr 2005 dargestellt. Zwischen den einzelnen Hybriden bzw. Saateletern konnten signifikante Unterschiede bei allen Merkmalen beobachtet werden. Die Saateletern x Umwelt Interaktion war ebenfalls für alle Merkmale signifikant. Die Interaktion von Saat- und Polleneltern konnte die Ausprägung des Stärkegehaltes, der Fallzahl, des Braunrostes und des Mehltaus nicht signifikant beeinflussen.

Aus den MQ-Werten wurde die Heritabilität der einzelnen Merkmale berechnet. Für den Stärkegehalt lag diese bei 91 %. Die Heritabilität des Proteingehalts war mit 95 % ebenfalls sehr hoch, während für den Kornertrag ein niedriger Wert von 13 % ermittelt wurde. Alle weiteren Merkmale wiesen hingegen ebenfalls hohe Heritabilitäten auf.

Tabelle 16: Varianztabelle und Heritabilität (h^2) für die Merkmale der Hybriden der HYBRO im Erntejahr 2005 (SE = Saaterter, PE = Pollenelter = Tester, FG = Freiheitsgrad, MQ = Mittleres Abweichungsquadrat)

Merkmal	SE		SE x Umwelt		SE x PE		Fehler		Heritabilität h^2
	FG	MQ	FG	MQ	FG	MQ	FG	MQ	
Stärkegehalt	22	6,24***	44	0,49**	104	0,33	208	0,26	91
Proteingehalt	22	2,88***	44	0,12***	104	0,06*	208	0,04	95
Kornertrag	22	182,73***	88	119,05**	104	117,60**	332	77,39	13
Stärkeertrag	22	57,48***	44	10,84***	104	5,67***	166	2,78	76
hl-Gewicht	22	19,98***	44	0,50***	104	0,53***	208	0,13	95
Tausendkornmasse	22	38,53***	44	3,46***	104	2,04***	208	0,70	88
Pflanzenhöhe	22	737,75***	88	41,40***	104	19,02***	416	10,04	93
Fallzahl	22	13002,10***	44	689,43***	104	326,25	208	261,45	94
Braunrost	22	9,29***	22	1,12***	104	0,45	104	0,37	87
Mehltau	22	5,99***	44	1,64***	104	0,66	208	0,68	73
Kornbreite	22	0,09***	44	0,01***	104	0,00***	208	0,00	89
Kornlänge	22	0,61***	44	0,02***	104	0,01***	208	0,01	97

*, **, *** signifikant bei $P = 0.05$, $P = 0.01$, und $P = 0.001$.

Die Korrelationen einiger untersuchter Merkmale der HYBRO-Hybriden für das Erntejahr 2005 sind in Tabelle 17 dargestellt. Mit Werten von -0,76 und -0,61 wurde die negative Beziehung von Protein- mit Stärkegehalt, Korn- und damit auch Stärkeertrag bestätigt, ebenso wie der positive Zusammenhang von Stärkegehalt, Korn- und Stärkeertrag. Bei der Auswertung der MARVIN-Analysen zeigte sich, wie auch in der Kalibrierungspopulation, eine hoch signifikante positive Korrelation der Kornbreite zur Tausendkornmasse, während die Kornlänge mit dem hl-Gewicht und der Fallzahl signifikant negativ korrelierte.

Tabelle 17: Korrelationskoeffizienten zwischen den untersuchten Merkmalen der Hybriden der HYBRO im Erntejahr 2005 (gemittelt über alle Polleneltern, Standorte und 2 Wiederholungen)

Merkmal	Stärke- gehalt	Protein- gehalt	Korn- ertrag	Stärke- ertrag	hl- Gewicht	TKM	Fall- zahl	Pflanzen- höhe	Korn- breite	Korn- länge
Stärke- gehalt	1	-0,76***	0,62**	0,80***	0,10	-0,16	0,17	0,40	-0,17	-0,05
Protein- gehalt		1	-0,61**	-0,71***	-0,03	0,14	-0,28	-0,26	0,07	0,08
Korn- ertrag			1	0,97***	0,12	0,25	-0,01	0,29	0,19	0,06
Stärke- ertrag				1	0,12	0,14	0,05	0,36	0,09	0,03
hl- Gewicht					1	-0,02	0,34	-0,08	0,05	-0,63**
TKM						1	-0,28	0,42*	0,79***	0,25
Fallzahl							1	-0,30	-0,03	-0,53**
Pflanzen- höhe								1	0,31	0,22
Korn- breite									1	-0,21
Korn- länge										1

*, **, *** signifikant bei P = 0.05, P = 0.01, und P = 0.001.

Die Ergebnisse der HYBRO-Hybriden werden in Tabelle 18 getrennt nach Standort betrachtet. Es konnten nicht alle Merkmale an jedem Versuchsort ermittelt werden. Für Kleptow wurde im Mittel mit 107,3 dt/ha der höchste Kornertrag erfasst, während Cappeln mit 67,5 dt/ha einen deutlich niedrigeren Ertrag aufwies. Die in Wulfsode angebaute Hybridkombinationen lagen mit einer durchschnittlichen Fallzahl von 170,2 s deutlich unter dem Mittel aller Standorte und wiesen zugleich den geringsten Proteingehalt auf. Bei den anderen erfassten Merkmalen gab es nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsstandorten.

Tabelle 18: Mittelwert, Minimum und Maximum für die wichtigsten Merkmale der Hybridkombinationen im Erntejahr 2005 an 5 Standorten der HYBRO (gemittelt über alle Polleneltern und 2 Wiederholungen)

Merkmal		Versuchsstandorte:				
		Cappeln	Kleptow	Moosberg	Poznan	Wulfstode
Stärkegehalt (%)	Mittel		61,8	59,7		63,1
	Min		60,3	58,7		61,6
	Max		63,1	61,3		64,6
Proteingehalt (%)	Mittel		9,6	10,3		8,5
	Min		8,9	9,6		7,9
	Max		10,6	11,0		9,6
Kornertrag (dt/ha)	Mittel	67,5	107,3	87,3	100,8	100,6
	Min	58,8	102,4	80,5	81,7	95,3
	Max	77,9	114,9	93,3	111,1	107,7
Stärkeertrag (dt/ha)	Mittel		66,0	52,2		63,6
	Min		59,7	45,4		53,8
	Max		74,0	60,7		72,0
hl-Gewicht (kg/100 l)	Mittel		75,0	74,2		72,3
	Min		72,4	71,9		70,1
	Max		76,3	75,7		73,7
Tausendkornmasse (g)	Mittel		34,5	40,6		39,7
	Min		31,1	37,2		37,3
	Max		38,8	43,8		42,3
Pflanzenhöhe (cm)	Mittel	149,4	143,6	159,2	157,1	153,0
	Min	144,4	130,7	143,1	148,4	136,6
	Max	155,5	154,6	169,9	164,2	164,8
Fallzahl (s)	Mittel		263,8	280,2		170,2
	Min		213,5	239,6		111,7
	Max		322,2	338,9		211,7
Braunrost (Bonitur 1-9)	Mittel	4,9	3,5			
	Min	3,2	1,9			
	Max	6,3	5,2			
Mehltau (Bonitur 1-9)	Mittel	2,6	2,4		3,0	
	Min	1,7	1,3		1,8	
	Max	3,5	3,6		5,3	
Kornbreite (mm)	Mittel		2,9	3,1		3,1
	Min		2,8	3,0		3,0
	Max		3,1	3,2		3,3
Kornlänge (mm)	Mittel		7,3	7,7		7,6
	Min		6,9	7,3		7,3
	Max		7,6	7,9		8,0

Tabelle 19 stellt die Ergebnisse der HYBRO-Hybriden getrennt nach Polleneltern dar. Die Verrechnung erfolgte gemittelt über die jeweils für die Merkmale vorhandenen Versuchsstandorte im Erntejahr 2005. Für HYPE1 wurde hierbei mit 102,8 dt/ha der höchste Kornertrag erfasst, während für HYPE6 mit 94,7 dt/ha der niedrigste Wert beobachtet wurde.

Auffällige Unterschiede bei der Betrachtung der übrigen Mittelwerte waren für die Fallzahl ersichtlich. Die niedrigste und höchste Fallzahl lagen bei 202,5 (HYPE4) und 259,4 s (HYPE5).

Tabelle 19: Mittelwerte der untersuchten Merkmale der HYBRO-Hybriden im Erntejahr 2005 getrennt für die 6 Polleneltern (gemittelt über 23 Saateltern, Standorte und 2 Wiederholungen)

Merkmal	Mittelwerte der Polleneltern:					
	HYPE1	HYPE2	HYPE3	HYPE4	HYPE5	HYPE6
Stärkegehalt (%)	61,6	61,3	61,5	62,0	61,1	62,1
Proteingehalt (%)	9,4	9,8	9,5	9,2	9,8	9,1
Kornertrag (dt/ha)	102,8	98,0	100,1	95,3	101,3	94,7
Stärkeertrag (dt/ha)	61,0	58,2	61,1	58,6	60,6	58,1
hl-Gewicht (kg/100 l)	74,3	74,7	74,4	72,1	75,4	72,2
Tausendkornmasse (g)	38,2	37,8	37,5	39,1	38,2	38,5
Pflanzenhöhe (cm)	149,4	152,7	156,2	151,6	156,3	148,6
Fallzahl (s)	248,6	227,6	251,3	202,5	259,4	239,7
Braunrost (Bonitur 1-9)	4,0	4,4	3,8	4,4	4,2	4,4
Mehltau (Bonitur 1-9)	2,5	2,5	3,0	3,1	3,1	2,8
Kornbreite (mm)	3,0	3,1	3,0	3,0	3,0	3,1
Kornlänge (mm)	7,7	7,3	7,5	7,8	7,4	7,5

Erntejahr 2006

Die Ergebnisse der HYBRO für das Erntejahr 2006 sind in Tabelle 20 dargestellt. Im Mittel über die betrachteten Versuchsstandorte konnte ein Stärkegehalt von 63,5 % für die Hybriden erfasst werden. Das Minimum und Maximum lagen bei 62,2 und 64,9 %. Dementsprechend betrug die Spannweite im Stärkegehalt 2,7 %. Für den Proteingehalt konnte im Mittel ein Wert von 8,7 % festgestellt werden. Es wurde ein durchschnittlicher Kornertrag von 83,3 dt/ha erfasst. Das Hektolitergewicht und die

Tausendkornmasse lagen im Mittel bei 74,3 kg/100 l und 34,1 g. Durchschnittlich wurde eine Fallzahl von 293,3 s beobachtet. Für Braunrost und Mehltau wurde ein gutes Resistenzniveau festgestellt. Kornbreite und -länge konnten für das Erntematerial im Jahr 2005 nicht über Marvinanalysen bestimmt werden.

Tabelle 20: Mittelwert, Minimum und Maximum für die wichtigsten Merkmale der HYBRO-Hybriden im Erntejahr 2006 (gemittelt über alle Polleneltern, Standorte und 2 Wiederholungen)

Merkmal	Mittel	Min	Max
Stärkegehalt (%)	63,5	62,2	64,9
Proteingehalt (%)	8,7	7,8	9,9
Kornertrag (dt/ha)	83,3	79,5	87,3
hl-Gewicht (kg/100 l)	74,3	71,5	75,8
Stärkeertrag (%)	57,1	53,0	60,4
Tausendkornmasse (g)	34,1	31,4	36,2
Fallzahl (s)	293,3	259,7	327,0
Pflanzenhöhe (cm)	134,0	119,6	142,4
Braunrost (Bonitur)	4,7	2,6	6,1
Mehltau (Bonitur)	3,2	2,1	4,9

Mit Hilfe des Statistikprogramms SAS wurde zunächst die Beziehung zwischen den Hybridkombinationen der HYBRO für das Erntejahr 2006 untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse befindet sich in Tabelle 21. Es konnten signifikante Unterschiede der Hybriden bzw. Saateltern hinsichtlich der erfassten Merkmale berechnet werden. Die Saatelter x Umwelt Interaktion war für die Merkmale ebenfalls signifikant. Sie konnte jedoch für den Mehлтаubefall nicht berechnet werden, da die Bonitur lediglich am Standort Kleptow erfolgte und somit kein Standortvergleich möglich war. Die Interaktion Saatelter x Polleneltern war für die bonitierten Blattkrankheiten nicht signifikant, aber für alle anderen Merkmale.

Für den Korn- und Stärkeertrag waren die aus den MQ-Werten berechneten Heritabilitätswerte mit 34 und 44 % gegenüber denen der anderen Merkmale gering.

Tabelle 21: Varianztabelle und Heritabilität (h^2) für die Merkmale der Hybriden der HYBRO des Erntejahres 2006 (SE = Saatelter, PE = Pollenelter = Tester, FG = Freiheitsgrad, MQ = Mittleres Abweichungsquadrat)

Merkmal	SE		SE x Umwelt		SE x PE		Fehler		Heritabilität h^2
	FG	MQ	FG	MQ	FG	MQ	FG	MQ	
Stärkegehalt	22	12,55***	44	0,74**	100	0,59***	571	0,33	92
Proteingehalt	22	7,10***	44	0,43***	100	0,19**	571	0,13	93
Kornertrag	22	177,61***	66	94,52***	100	47,05***	653	24,22	34
Stärkeertrag	22	104,75***	44	48,97***	100	21,49***	506	11,34	44
hl-Gewicht	22	35,14***	44	2,81***	100	1,33***	568	0,61	88
Tausendkorn- masse	22	66,13***	44	11,00***	100	5,00***	567	3,13	81
Pflanzenhöhe	22	1199,61***	66	82,78***	100	35,97***	730	23,02	92
Fallzahl	22	9366,11***	44	498,69***	100	283,09**	567	194,65	94
Braunrost	22	14,36***	22	3,29***	100	0,56	274	0,43	76
Mehltau	22	4,16***			100	0,7	82	0,6	98

*, **, *** signifikant bei $P = 0.05$, $P = 0.01$, und $P = 0.001$.

Die Korrelationen einiger untersuchter Merkmale der HYBRO-Hybriden für das Erntejahr 2006 sind in Tabelle 22 dargestellt. Berechnungsgrundlage bildeten die Mittelwerte der Hybridkombinationen über die verschiedenen Tester (Polleneltern), Versuchsstandorte und 2 Wiederholungen. Auch im zweiten Anbaujahr der HYBRO bestätigt sich der signifikante Zusammenhang von Stärkegehalt, Proteingehalt und Kornertrag. Des Weiteren korrelierten die Merkmale Tausendkornmasse und Pflanzenhöhe signifikant miteinander.

Tabelle 22: Korrelationskoeffizienten zwischen den untersuchten Merkmalen der Hybriden der HYBRO im Erntejahr 2006 (gemittelt über alle Polleneltern, Standorte und 2 Wiederholungen)

Merkmal	Stärke- gehalt	Protein- gehalt	Korn- ertrag	Stärke- ertrag	hl- Gewicht	TKM	Fall- zahl	Pflanzen- höhe
Stärke- gehalt	1	-0,67***	0,60**	0,83***	0,34	0,03	-0,20	0,42
Protein- gehalt		1	-0,69***	-0,81***	-0,28	0,02	-0,11	-0,24
Korn- ertrag			1	0,92***	0,05	0,34	-0,05	0,37
Stärke- ertrag				1	0,25	0,25	-0,10	0,43
hl- Gewicht					1	-0,27	0,30	-0,05
TKM						1	-0,31	0,67***
Fallzahl							1	-0,28
Pflanzen- höhe								1

*, **, *** signifikant bei P = 0.05, P = 0.01, und P = 0.001.

In Tabelle 23 werden die Mittelwerte, das Minimum und Maximum der Merkmale der HYBRO-Hybriden für die Versuchsstandorte des Erntejahres 2006 dargestellt. Mit 102,0 dt/ha konnte in Wulfsode der höchste Kornertrag ermittelt werden, während Poznan mit 63,1 dt/ha einen vergleichsweise ertragsschwachen Standort darstellte.

Tabelle 23: Mittelwert, Minimum und Maximum für die wichtigsten Merkmale der Hybridkombinationen im Erntejahr 2006 an 4 Standorten der HYBRO (gemittelt über alle Polleneltern und 2 Wiederholungen)

Merkmal		Versuchsstandorte:			
		Kleptow	Moosberg	Poznan	Wulfsode
Stärkegehalt (%)	Mittel	63,5	63,6		63,3
	Min	62,0	62,0		61,9
	Max	64,8	65,4		64,4
Proteingehalt (%)	Mittel	8,7	9,2		8,1
	Min	7,7	8,4		7,4
	Max	9,8	10,6		9,2
Kornertrag (dt/ha)	Mittel	86,8	81,3	63,1	102,0
	Min	79,2	75,5	57,7	93,6
	Max	92,8	86,4	69,4	109,2
Stärkeertrag (dt/ha)	Mittel	55,1	51,7		64,6
	Min	49,8	47,1		58,3
	Max	59,1	56,0		69,2
hl-Gewicht (kg/100 l)	Mittel	74,4	74,1		74,4
	Min	71,0	71,4		72,0
	Max	76,6	75,6		76,1
Tausendkornmasse (g)	Mittel	28,4	36,0		37,7
	Min	24,8	32,0		35,2
	Max	30,9	40,7		40,3
Pflanzenhöhe (cm)	Mittel	140,8	134,6	123,8	136,7
	Min	126,0	120,5	114,4	117,0
	Max	151,3	144,2	133,8	145,8
Fallzahl (s)	Mittel	281,3	278,7		319,9
	Min	240,8	247,2		291,2
	Max	322,4	314,7		349,8
Braunrost (Bonitur 1-9)	Mittel	5,9		3,5	
	Min	3,1		2,0	
	Max	7,3		5,1	
Mehltau (Bonitur 1-9)	Mittel	3,2			
	Min	2,1			
	Max	4,9			

Tabelle 24 zeigt die Mittelwerte der im Erntejahr 2006 erfassten Merkmale getrennt nach den 6 Polleneltern. Für Hybridkombinationen bei denen die Polleneltern HYPE4 und HYPE6 zu deren Erstellung verwendet wurden, konnte der höchste Stärkegehalt mit 64,0 % ermittelt werden. Den höchsten Kornertrag mit 91,2 dt/ha wiesen die Kreuzungskombinationen mit HYPE6 auf. Hybriden, die mit HYPE4 als Polleneltern erzeugt wurden, waren insgesamt anfälliger gegenüber Braunrost und Mehltau. Weitere

signifikante Unterschiede in Bezug auf die väterlichen Inzuchtlinien konnten nicht beobachtet werden.

Tabelle 24: Mittelwerte der untersuchten Merkmale der HYBRO-Hybriden im Erntejahr 2006 getrennt für die 6 Polleneltern (gemittelt über 23 Saateltern, Standorte und 2 Wiederholungen)

Merkmal	Mittelwerte der Polleneltern:					
	HYPE1	HYPE2	HYPE3	HYPE4	HYPE5	HYPE6
Stärkegehalt (%)	63,0	63,1	63,4	64,0	63,6	64,0
Proteingehalt (%)	8,5	8,7	8,7	8,7	8,9	8,4
Kornertrag (dt/ha)	84,4	83,1	82,6	90,5	81,1	91,2
Stärkeertrag (dt/ha)	57,5	56,7	57,4	58,0	56,1	58,3
hl-Gewicht (kg/100 l)	74,2	75,5	74,0	73,3	75,2	73,6
Tausendkornmasse (g)	33,7	33,3	33,3	35,3	33,8	35,0
Pflanzenhöhe (cm)	130,9	133,4	135,2	142,9	131,5	140,4
Fallzahl (s)	292,6	283,0	299,6	276,7	307,0	296,7
Braunrost (Bonitur 1-9)	4,8	5,0	4,6	5,9	4,5	5,5
Mehltau (Bonitur 1-9)	2,8	2,6	2,7	4,2	2,2	3,7

Untersuchung des Jahreseffektes

Mit Hilfe der Varianzanalyse konnten signifikante Unterschiede zwischen den Jahren 2005 und 2006 für die in Tabelle 25 dargestellten Merkmale der HYBRO-Hybriden erfasst werden. Die Jahr x Saatealter Interaktion war für die Merkmale ebenfalls signifikant.

Bei Betrachtung von Jahr und Umwelt wurde festgestellt, dass deren Beziehung die Merkmalsausprägung deutlich beeinflusste. Dies konnte jedoch für Braunrost und Mehltau nicht berechnet werden, da nur jeweils ein Standort in beiden Erntejahren gleichzeitig bonitiert wurde.

Tabelle 25: Varianztabelle für die Merkmale der Hybriden der HYBRO in den Erntejahren 2005 und 2006 (SE = Saatelter, FG = Freiheitsgrad, MQ = Mittleres Abweichungsquadrat)

Merkmal	Jahr		Jahr x SE		Jahr x Umwelt		Fehler	
	FG	MQ	FG	MQ	FG	MQ	FG	MQ
Stärkegehalt	1	969,08***	22	1,01***	2	309,71***	934	0,36
Proteingehalt	1	174,63***	22	0,41***	2	10,65***	934	0,11
Kornertrag	1	25749,10***	22	188,17***	3	23682,88***	1162	49,13
Stärkeertrag	1	1619,57***	22	28,12***	2	2989,47***	825	10,5
hl-Gewicht	1	59,35***	22	2,67***	2	179,87***	931	0,60
Tausendkorn- masse	1	4485,21***	22	7,09***	2	390,14***	930	2,57
Pflanzenhöhe	1	117693,53***	22	57,72***	3	13591,77***	1325	23,53
Fallzahl	1	768542,94***	22	4599,93***	2	585327,52***	930	241,76
Braunrost	1	83,30***	22	1,20***			479	0,43
Mehltau	1	32,24***	22	1,37**			390	0,65

*, **, *** signifikant bei $P = 0.05$, $P = 0.01$, und $P = 0.001$.

Tabelle 26 zeigt die Korrelation der Hauptmerkmale zwischen den Erntejahren 2005 und 2006. Lediglich für den Kornertrag konnte keine signifikante Korrelation zwischen den 2 Jahren beobachtet werden.

Tabelle 26: Korrelationskoeffizienten zwischen den untersuchten Merkmalen der Hybriden der HYBRO in den beiden Erntejahr 2005 und 2006 (gemittelt über alle Polleneltern, Standorte und 2 Wiederholungen)

		2005							
	Merkmal	Stärke- gehalt	Protein- gehalt	Korn- ertrag	Stärke- ertrag	hl- Gewicht	TKM	Fall- zahl	Pflanzen- höhe
2006	Stärke- gehalt	0,88***	-0,62**	0,55**	0,71***	0,27	0,03	0,07	0,44*
	Protein- gehalt	-0,71***	0,91***	-0,62**	-0,70***	-0,24	0,07	-0,20	-0,25
	Korn- ertrag	0,56**	-0,64***	0,41	0,49*	-0,02	0,24	-0,01	0,35
	Stärke- ertrag	0,75***	-0,73***	0,55**	0,66***	0,21	0,20	0,05	0,42*
	hl- Gewicht	0,19	-0,13	0,08	0,12	0,88***	-0,20	0,44*	-0,09
	TKM	-0,10	0,06	0,08	0,03	-0,20	0,87***	-0,34	0,62**
	Fallzahl	-0,12	-0,15	0,00	-0,04	0,34	-0,18	0,70***	-0,37
	Pflanzen- höhe	0,39	-0,25	0,28	0,34	-0,05	0,49*	-0,21	0,95***

*, **, *** signifikant bei P = 0.05, P = 0.01, und P = 0.001.

3.2.3 Bestimmung der Bioethanolausbeute

Erste Ergebnisse zur Bestimmung der Bioethanolausbeute in Verbindung mit einer erneuten Erfassung des Stärkegehaltes liegen für ausgewählte Hybriden des Erntejahres 2005 der KWS Lochow und HYBRO vor (Tabellen 27 und 28).

Das Material der KWS Lochow bekam von der Züchtungsfirma für diese Analysen eine Verschlüsselung (LP_a – LP_o), so dass keine Zuordnung zu den elterlichen Inzuchtlinien möglich ist. Die durchschnittliche Alkoholausbeute für lag bei 39,3 l/100 kg mit einem Minimum und Maximum von 38,6 bzw. 40,2 l/100 kg, was in einer Spannweite von 1,6 l/100 kg resultiert. Der durchschnittliche Stärkegehalt der 15 Hybriden lag bei 64,3 %. Es wurde ein Maximum von 67,1 % und ein Minimum von 59,5 % ermittelt. Die Spannweite im Stärkegehalt betrug 7,6 %.

Tabelle 27: Ergebnisse der Bioethanolausbeute- und Stärkegehaltsbestimmung ermittelt an 15 Hybriden der KWS Lochow

Hybriden	Alkoholausbeute (l/100 kg)	Stärkegehalt (%)
LP a	39,7	66,8
LP b	39,3	64,2
LP c	40,2	67,1
LP d	39,8	66,9
LP e	40,1	67,1
LP f	38,6	65,4
LP g	38,6	61,3
LP h	39,3	66,3
LP i	39,0	63,6
LP j	38,6	63,4
LP k	38,6	63,1
LP l	39,3	59,5
LP m	39,8	64,9
LP n	39,3	62,4
LP o	38,8	63,4
Mittel	39,3	64,3
Minimum	38,6	59,5
Maximum	40,2	67,1

Von den HYBRO-Hybriden HYL04, HYL09 und HYL15 wurden jeweils zwei Saatgut-Proben hinsichtlich ihrer Alkoholausbeute analysiert. Die Einzelergebnisse sind hinter den berechneten Mittelwerten in Klammern aufgeführt (Tabelle 28). Für die Hybriden HYL09 und HYL15 konnten keine Unterschiede zwischen beiden Analysen festgestellt werden. Bei HYL04 wurde eine Differenz von 1 l/100 kg beobachtet.

Insgesamt lag die durchschnittliche Alkoholausbeute der HYBRO-Hybriden bei 39,1 l/100 kg. Die maximale Bioethanolausbeute betrug 39,8 l/100 kg. Der geringste Wert lag bei 37,9 l/100 kg, was einer Spannweite von 1,9 l/100 kg entspricht. Der durchschnittliche Stärkegehalt der Hybriden der HYBRO betrug 61,6 %. Es wurde ein Maximum von 63,0 % und ein Minimum von 60,6 % ermittelt. Die Spannweite im Stärkegehalt lag bei 2,4 %.

Tabelle 28: Ergebnisse der Bioethanolausbeute- und Stärkegehaltsbestimmung ermittelt an 12 Hybriden der HYBRO

Hybriden	Alkoholausbeute (l/100 kg)	Stärkegehalt (%)
HYL01	37,9	60,9
HYL04	39,8 (39,3; 40,3)	63,0
HYL05	39,6	62,2
HYL06	39,3	62,7
HYL07	39,3	61,1
HYL09	38,6 (38,6; 38,6)	60,6
HYL10	38,6	61,9
HYL12	38,7	60,9
HYL13	39,3	61,1
HYL15	39,3 (39,3; 39,3)	62,2
HYL16	39,4	61,1
HYL17	39,0	61,9
Mittel	39,1	61,6
Minimum	37,9	60,6
Maximum	39,8	63,0

In Tabelle 29 sind die Korrelationskoeffizienten zwischen der Alkoholausbeute und weiteren Merkmalen der untersuchten Hybriden beider Züchter dargestellt. Da eine hohe Alkoholausbeute über einen hohen Stärkegehalt erzielbar ist, konnte auch bei dieser Untersuchung eine signifikant positive Korrelation von 0,79 und 0,58 für die Hybriden von KWS Lochow und HYBRO festgestellt werden. Des Weiteren bestätigt sich bei den Hybriden der KWS Lochow der positive Einfluss eines hohen Korn- und Stärkeertrages. Eine hoch signifikante negative Korrelation ergab sich zum Proteingehalt.

Einzelne Ergebnisse zu den erfassten Merkmalen sind für das ausgewählte Versuchsmaterial beider Züchter in den Tabellen A3 und A4 im Anhang dargestellt (S. 135/136).

Tabelle 29: Korrelationskoeffizienten zwischen der Alkoholausbeute und weiteren Merkmalen der untersuchten Hybriden von KWS Lochow und HYBRO

Merkmal	Alkoholausbeute bei den Hybriden von:	
	KWS Lochow	HYBRO
Stärkegehalt	0,79***	0,58*
Proteingehalt	-0,82***	-0,36
Kornertrag	0,73**	0,27
hl-Gewicht	0,18	0,29
Stärkeertrag	0,87***	0,40
TKM	0,34	0,36
Pflanzenhöhe	-0,16	0,21
Fallzahl	-0,01	0,24

*, **, *** signifikant bei P = 0.05, P = 0.01, und P = 0.001.

3.3 Molekulargenetische Verfahren

3.3.1 SSR-Analyse

Einen Überblick zu den Ergebnissen der Mikrosatelliten-Analyse geben die Tabellen 30 und 31. Für die Genotypisierung der Elternlinien der KWS Lochow wurden 133 SSR-Marker eingesetzt. Es konnten 411 verschiedene Allele analysiert werden. Innerhalb der Pollen- und Saateltern wurden 94 bzw. 74 % polymorphe Banden detektiert.

Die Elternlinien der HYBRO wurden mit 252 SSR-Markern genotypisiert. Es wurden 596 Allele detektiert, wovon insgesamt 524 (88 %) polymorph waren. Innerhalb der Polleneltern der HYBRO waren 64 % der Banden polymorph und in den Saateltern 86 %.

Tabelle 30: Ergebnisse der SSR-Analyse; ermittelt mit 133 Markern in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der KWS Lochow (PE = Polleneltern, SE = Saateltern)

	Anzahl aller Banden			Anzahl polymorpher Banden			% polymorphe Banden		
	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE
Σ	429	386	272	411	363	201			
Mittel	3,2	2,9	2,1	3,1	2,7	1,5	96	94	74

Tabelle 31: Ergebnisse der SSR-Analyse; ermittelt mit 252 Markern in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der HYBRO (PE = Polleneltern, SE = Saateltern)

	Anzahl aller Banden			Anzahl polymorpher Banden			% polymorphe Banden		
	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE
Σ	596	439	548	524	279	470			
Mittel	2,4	1,7	2,2	2,1	1,1	1,9	88	64	86

In den Tabellen 32 bis 35 werden die Ergebnisse der SSR-Analyse an den Inzuchtlinien der KWS Lochow und HYBRO getrennt nach Mikrosatellitentyp dargestellt. Zunächst amplifizierten die 22 bzw. 9 genomischen SSR-Marker insgesamt durchschnittlich 4,73 und 6,0 Banden pro Primerpaar in den Pollen- und Saateltern beider Züchter. Der Prozentsatz polymorpher Fragmente lag bei 95 (PE) und 80 (SE) % in den Roggenlinien der KWS Lochow, sowie 96 (PE) und 100 (SE) % im Material der HYBRO.

Insgesamt konnten 111 bzw. 243 EST-SSR-Marker für die Charakterisierung der Saat- und Polleneltern beider Züchter eingesetzt werden. Im Durchschnitt amplifizierten sie 2,93 und 2,23 Fragmente je Mikrosatellit. Für die Inzuchtlinien der KWS Lochow wurden 93 (PE) bzw. 60 (SE) % der Banden als polymorph detektiert. In den Pollen- und Saateltern der HYBRO konnten 61 (PE) und 85 (SE) % der Fragmente für eine Differenzierung herangezogen werden.

Tabelle 32: Ergebnisse der SSR-Analyse; ermittelt mit 22 genomischen SSR-Markern in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der KWS Lochow (PE = Polleneltern, SE = Saateltern)

	Anzahl aller Banden			Anzahl polymorpher Banden			% polymorphe Banden		
	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE
Σ	104	85	60	101	81	50			
Mittel	4,73	3,86	2,73	4,59	3,68	2,27	97	95	80

Tabelle 33: Ergebnisse der SSR-Analyse; ermittelt mit 111 EST-SSR-Markern in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der KWS Lochow (PE = Polleneltern, SE = Saateltern)

	Anzahl aller Banden			Anzahl polymorpher Banden			% polymorphe Banden		
	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE
Σ	325	301	212	310	282	151			
Mittel	2,93	2,71	1,91	2,79	2,54	1,36	95	93	60

Tabelle 34: Ergebnisse der SSR-Analyse; ermittelt mit 9 genomischen SSR-Markern in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der HYBRO (PE = Polleneltern, SE = Saateltern)

	Anzahl aller Banden			Anzahl polymorpher Banden			% polymorphe Banden		
	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE
Σ	54	27	45	54	26	45			
Mittel	6,00	3,00	5,00	6,00	2,89	5,00	100	96	100

Tabelle 35: Ergebnisse der SSR-Analyse; ermittelt mit 243 EST-SSR-Markern in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der HYBRO (PE = Polleneltern, SE = Saateltern)

	Anzahl aller Banden			Anzahl polymorpher Banden			% polymorphe Banden		
	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE
Σ	542	412	503	470	253	425			
Mittel	2,23	1,70	2,07	1,93	1,04	1,75	87	61	85

3.3.2 AFLP-Analyse

Mit der AFLP-Analyse konnte eine Vielzahl an Polymorphismen in den Saat- und Polleneltern beider Züchter nachgewiesen werden. Die 56 Primerkombinationen (16 *PstI-MseI* und 40 *EcoRI-MseI*) zeigten im Mittel für die Saat- und Polleneltern der KWS Lochow und HYBRO 46,2 und 46,4 Banden pro Primerkombination mit Größen von 70 bis 400 Basenpaaren (bp; Tabellen 36 und 37). Im Durchschnitt konnten 44,3 Fragmente pro Primerkombination für die Polleneltern und 36,5 für die Saateltern der KWS Lochow ausgewertet werden. Es wurden 65 bzw. 37 % der Banden als polymorph detektiert. Für die 23 Saat- und 6 Polleneltern der HYBRO konnten in der AFLP-Analyse durchschnittlich 44,6 und 38,2 Fragmente pro Primerkombination beobachtet werden. Der Prozentsatz polymorpher Banden lag in diesem Versuchsmaterial bei 67 und 46 %.

Werden die Ergebnisse der beiden verwendeten Enzymkombinationen getrennt betrachtet, so fällt auf, dass innerhalb des Versuchsmaterials beider Züchter mit den 16 *PstI-MseI*-Primerkombinationen ein höherer Prozentsatz polymorpher Banden erreicht wurde. Für die Inzuchtlinien der KWS Lochow und HYBRO konnten dabei insgesamt 69 und 79 % der Fragmente für eine Differenzierung herangezogen werden. Die 40 *EcoRI-MseI*-Primerkombinationen amplifizierten hingegen mit 61 bzw. 62 % deutlich weniger polymorphe Banden.

P17/M57 und E31/M50 zeigten jeweils in den Elternlinien von KWS Lochow und HYBRO den höchsten und niedrigsten Polymorphismus.

Tabelle 36: Ergebnisse der AFLP-Analyse mit 16 *PstI-MseI* und 40 *EcoRI-MseI* Primerkombinationen in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der KWS Lochow (PE = Polleneltern; SE = Saateltern)

Primer- kombinationen		Anzahl aller Banden			Anzahl polymorpher Banden			% polymorphe Banden		
		Σ	PE	SE	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE
P12	M47	75	72	57	47	42	15	63	58	26
P12	M48	61	60	52	50	48	23	82	80	44
P12	M49	82	80	68	61	59	31	74	74	46
P12	M50	93	89	80	69	64	37	74	72	47
P12	M51	81	80	65	58	57	25	72	71	39
P12	M52	64	63	53	50	49	23	78	78	43
P12	M53	33	33	27	25	25	9	76	76	33
P12	M54	48	47	38	27	25	14	56	53	37
P12	M55	39	38	31	22	21	9	56	55	29
P12	M56	29	28	24	20	18	9	69	64	38
P12	M57	50	51	27	43	44	8	86	86	30
P12	M58	39	38	20	32	31	10	82	82	50
P12	M59	62	61	55	39	38	23	63	62	42
P12	M61	49	49	45	31	29	20	63	59	44
P12	M62	72	70	55	59	57	19	82	81	35
P17	M57	59	58	37	57	56	28	97	97	76
Σ		936	917	734	643	663	303			
Mittel		58,5	57,3	45,9	40,2	41,4	18,9	69	72	41
E31	M47	19	19	19	5	5	1	26	26	5
E31	M50	32	32	31	7	7	5	22	22	16
E31	M57	40	39	36	22	20	11	55	51	31
E32	M47	68	68	63	26	24	16	38	35	25
E32	M49	48	48	40	24	24	7	50	50	18
E32	M52	35	35	28	18	18	6	51	51	21
E32	M61	69	68	54	39	35	15	57	52	28
E34	M55	39	38	29	32	31	14	82	82	48
E34	M58	36	25	22	27	16	11	75	64	50
E34	M61	32	31	26	20	19	11	63	61	42
E35	M57	36	36	29	26	25	15	72	69	52
E35	M61	61	61	49	39	38	21	64	62	43
E36	M48	46	45	39	29	28	10	63	62	26
E36	M49	49	48	40	25	23	9	51	48	23
E36	M56	26	26	22	18	18	7	69	69	32
E36	M57	44	42	34	29	26	15	66	62	44
E36	M59	66	44	29	41	39	11	62	89	38
E36	M60	61	40	33	36	32	17	59	80	52
E36	M61	48	47	39	33	32	13	69	68	33

Fortsetzung Tabelle 36

Primer- kombinationen		Anzahl aller Banden			Anzahl polymorpher Banden			% polymorphe Banden		
		Σ	PE	SE	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE
E36	M62	50	49	46	19	17	7	38	35	15
E37	M47	58	56	47	45	42	21	78	75	45
E37	M48	42	41	33	31	30	14	74	73	42
E37	M49	32	30	20	25	22	10	78	73	50
E37	M50	48	46	41	26	23	13	54	50	32
E37	M53	29	28	20	19	18	5	66	64	25
E38	M53	32	32	24	21	21	6	66	66	25
E40	M47	34	34	28	21	21	9	62	62	32
E40	M56	30	30	24	24	24	14	80	80	58
E41	M49	50	49	41	39	38	21	78	78	51
E41	M53	42	40	33	30	29	17	71	73	52
E41	M57	25	23	19	20	18	9	80	78	47
E41	M61	32	32	29	21	21	15	66	66	52
E42	M47	53	52	44	33	31	12	62	60	27
E42	M54	45	45	37	25	25	8	56	56	22
E42	M56	32	28	27	22	17	15	69	61	56
E42	M57	37	37	28	19	19	7	51	51	25
E42	M58	39	37	30	27	25	12	69	68	40
E42	M60	32	30	29	17	15	8	53	50	28
E42	M62	35	35	29	18	18	8	51	51	28
E46	M62	20	20	18	5	5	2	25	25	11
Σ		1652	1566	1309	1003	939	448			
Mittel		41,3	39,2	32,7	25,1	23,5	11,2	61	60	34
Σ gesamt		2588	2483	2043	1646	1602	751			
Mittel gesamt		46,2	44,3	36,5	29,9	28,6	13,4	64	65	37

Tabelle 37: Ergebnisse der AFLP-Analyse mit 16 *Pst*I-*Mse*I und 40 *Eco*RI-*Mse*I Primerkombinationen in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der HYBRO (PE = Polleneltern; SE = Saateltern)

Primer- kombinationen		Anzahl aller Banden			Anzahl polymorpher Banden			% polymorphe Banden		
		Σ	PE	SE	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE
P12	M47	86	86	62	66	65	35	77	76	57
P12	M48	65	65	45	55	55	26	85	85	58
P12	M49	84	83	51	68	66	23	81	80	45
P12	M50	95	95	76	75	75	35	79	79	46
P12	M51	80	77	65	62	59	33	78	77	51
P12	M52	70	67	61	58	55	40	83	82	66
P12	M53	32	30	29	26	24	16	81	80	55
P12	M54	50	50	46	33	32	21	66	64	46
P12	M55	39	38	33	26	26	18	67	68	55
P12	M56	27	27	23	20	20	10	74	74	44
P12	M57	55	54	42	49	48	27	89	89	64
P12	M58	46	45	34	40	39	22	87	87	65
P12	M59	66	66	51	46	46	27	70	70	53
P12	M61	50	50	45	39	37	22	78	74	49
P12	M62	73	73	49	59	58	22	81	80	45
P17	M57	63	61	46	57	54	33	90	89	72
Σ		981	967	758	779	759	410			
Mittel		61,3	60,4	47,4	48,7	47,4	25,6	79	79	54
E31	M47	19	19	18	5	5	3	26	26	17
E31	M50	29	29	28	6	6	5	21	21	18
E31	M57	35	35	29	20	20	12	57	57	41
E32	M47	68	68	62	30	30	14	44	44	23
E32	M49	51	50	45	31	30	21	61	60	47
E32	M52	32	32	30	18	18	13	56	56	43
E32	M61	66	64	57	38	36	18	58	56	32
E34	M55	41	41	31	33	33	20	80	81	65
E34	M58	33	29	28	21	17	10	64	59	36
E34	M61	33	32	30	22	21	12	67	66	40
E35	M57	39	39	34	28	28	18	72	72	53
E35	M61	60	58	54	35	33	29	58	57	54
E36	M48	52	49	44	34	31	18	65	63	41
E36	M49	44	43	38	22	22	8	50	51	21
E36	M56	21	21	18	15	15	7	71	71	39
E36	M57	42	41	37	25	24	14	60	59	38
E36	M59	64	41	38	41	39	27	64	95	71
E36	M60	57	37	32	30	30	16	53	81	50
E36	M61	49	49	39	36	36	18	73	74	46
E36	M62	51	49	48	26	22	18	51	45	38
E37	M47	61	56	54	51	47	28	84	84	52
E37	M48	39	39	34	29	29	16	74	74	47
E37	M49	32	31	27	25	24	14	78	77	52

Fortsetzung Tabelle 37

Primer- kombinationen		Anzahl aller Banden			Anzahl polymorpher Banden			% polymorphe Banden		
		Σ	PE	SE	Σ	PE	SE	Σ	PE	SE
E37	M50	48	47	45	28	27	22	58	58	49
E37	M53	28	26	25	20	18	13	71	69	52
E38	M53	28	27	24	16	15	12	57	56	50
E40	M47	31	29	29	17	15	12	55	52	41
E40	M56	29	26	25	25	22	18	86	85	72
E41	M49	48	44	42	36	32	22	75	73	52
E41	M53	41	40	34	29	27	21	71	68	62
E41	M57	23	23	18	18	18	8	78	78	44
E41	M61	30	29	26	19	19	13	63	66	50
E42	M47	53	52	51	33	32	19	62	62	37
E42	M54	43	39	41	20	16	11	47	41	27
E42	M56	35	33	28	25	24	15	71	73	40
E42	M57	36	35	29	19	18	10	53	51	35
E42	M58	40	39	29	28	27	13	70	69	45
E42	M60	33	33	29	17	17	9	52	52	31
E42	M62	35	35	31	22	22	13	36	63	42
E46	M62	21	21	21	8	7	6	38	33	29
Σ		1620	1530	1382	1001	952	596			
Mittel		40,5	38,3	34,6	25	23,8	14,9	62	62	43
Σ gesamt		2601	2497	2140	1780	1711	1006			
Mittel gesamt		46,4	44,6	38,2	31,8	30,6	18	66	67	46

3.3.3 Entwicklung von PCR-Primern für Kandidatengene der Stärkebiosynthese

Bei der Primerentwicklung waren Genbereiche von Interesse, die für Enzyme des Stärkemetabolismus kodieren. Insgesamt konnten 47 Primerpaare aus bereits bekannten Sequenzen abgeleitet werden. Um diese auf ihre Funktionsfähigkeit zu testen, wurde eine PCR mit DNA von Gerste (Sorten: 'Barke'), Weizen (Labormaterial der Professur für Pflanzenzüchtung in Halle), Reis (Labormaterial der Professur für Pflanzenzüchtung in Halle) und Roggen (Inzuchtlinien der KWS Lochow und HYBRO) durchgeführt.

Im Roggen zeigten 17 Primerpaare keine Amplifikation. Bei 6 Primerpaaren gelang es nicht, die PCR für eine erfolgreiche Auswertung zu optimieren. Die Amplifikationsprodukte konnten mittels Gelelektrophorese nicht ausgewertet werden bzw. waren nicht reproduzierbar. Es wurden schließlich 24 gut in Roggen funktionierende Primerpaare für die weitere Bearbeitung ausgewählt. Darunter befand sich keine Sequenz aus Reis. In Tabelle 38 sind die jeweiligen Sequenzen und die zur Entwicklung herangezogenen Genbankherkünfte aufgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden optimiert, wobei lediglich die Annealingtemperatur und die Anzahl der PCR-Zyklen bei einzelnen Primerpaaren unterschiedlich waren. Alle 24 Paare amplifizierten ebenfalls in Gerste, 20 davon in Weizen und 12 in Reis. Tabelle 39 gibt einen Überblick zu den in den verschiedenen Getreidearten detektierten Fragmentgrößen.

Tabelle 38: Primerpaare, deren Sequenzen, die Genbankherkunft der zur Entwicklung verwendeten Sequenzabschnitte und die erforderlichen PCR-Bedingungen (F = Forward-Primer, R = Reverse-Primer)

Primerpaar		Sequenz (5'→3')	Genbankkzession	PCR-Bedingungen	
				Annealing-temperatur	Anzahl Zyklen
Hw3	F	CATATACGATCTGGATCCCAAGTT	AY304541 <i>Hordeum vulgare</i> starch branching enzym I (sbeI) mRNA, partial cds; nuclear gene for plastid product.	55°C	45
Hw3	R	CGAAATTTAACCTTGGAAATTATGG			
sbeI1	F	GTCAATCAGGATTTCCCATGTC	AY304541 <i>Hordeum vulgare</i> starch branching enzym I (sbeI) mRNA, partial cds; nuclear gene for plastid product.	55°C	45
sbeI1	R	AATTCGTCCATCCAATATCTCAG			
sbeI2	F	GATAGCCGCCTGTTCACATATG	AY304541 <i>Hordeum vulgare</i> starch branching enzym I (sbeI) mRNA, partial cds; nuclear gene for plastid product.	55°C	45
sbeI2	R	ACATGCCAGTATACATTTCTTGTC			
sbeI3	F	TCTCTTGATGGACAAGGAAATGTA	AY304541 <i>Hordeum vulgare</i> starch branching enzym I (sbeI) mRNA, partial cds; nuclear gene for plastid product.	55°C	45
sbeI3	R	CTTGATCGTAGGTGATCAATGTC			
sbeI4	F	AGAGAAGGCAACAATTGGAGTTAT	AY304541 <i>Hordeum vulgare</i> starch branching enzym I (sbeI) mRNA, partial cds; nuclear gene for plastid product.	55°C	45
sbeI4	R	GTTTTATTGGGATGGAAATTGAAG			
Hw7	F	CTTCTATCATCATCAAAGCAGATT	AY304541 <i>Hordeum vulgare</i> starch branching enzym I (sbeI) mRNA, partial cds; nuclear gene for plastid product.	55°C	45
Hw6	R	GTGGAGACAAGATTTGAATGAGTT			
Hw8	F	CACTCACATCACCTGAAGGAATA	AY304541 <i>Hordeum vulgare</i> starch branching enzym I (sbeI) mRNA, partial cds; nuclear gene for plastid product.	55°C	45
Hw8	R	CTCATCATCACCGCTTATTTATCTT			
GBSSI2	F	AACCTCAACAACAACCCCTACTT	AB089162 <i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare GBSSI gene for granule bound starch synthase I.	55°C	45
GBSSI2	R	GTAGTTGACGGCGAGGAAGCTT			
GBSSI4	F	AGGACGTCCAGATCATTCTCCT	AY011009 <i>Secale cereale</i> clone 1a granule-bound starch synthase (GBSSI) gene, exons 9 through 14, partial cds.	55°C	45
GBSSI4	R	AGCACGTCCTCCAGTTCTT			
GBSSII1	F	TGAAACCCATCGTAATTCTAGTAGG	AF486521 <i>Hordeum vulgare</i> granule bound starch synthase Ib precursor, mRNA, partial cds.	55°C	45
GBSSII1	R	GTAATGATCATAGCGAGGAGCTATC			
GBSSII2	F	GGTGATGTTGTAGGGGGATTG	AF486521 <i>Hordeum vulgare</i> granule bound starch synthase Ib precursor, mRNA, partial cds.	55°C	45
GBSSII2	R	ACCATACAATTTTGATCCAGTTTGT			
GBSSII3	F	ACTGCTACAAAAGGGGTGTTGAT	AF486521 <i>Hordeum vulgare</i> granule bound starch synthase Ib precursor, mRNA, partial cds.	55°C	45
GBSSII3	R	CCATATGGTCCAGAGAAATATTCAG			
GBSSII4	F	CAAGGGTCTTAATCTCAACAATTC	AF486521 <i>Hordeum vulgare</i> granule bound starch synthase Ib precursor, mRNA, partial cds.	55°C	40
GBSSII4	R	AAATCAAATGAAGGCATGAAACTT			
GBSSII5	F	CAGAGCAGACTTCGAACTTCTTAAT	AF486521 <i>Hordeum vulgare</i> granule bound starch synthase Ib precursor, mRNA, partial cds.	55°C	40
GBSSII5	R	CATCCAACCTCAACACCTTTCTCT			
GBSSII7	F	TCAATAAAGAAATACTGCAAGCTGA	AF486521 <i>Hordeum vulgare</i> granule bound starch synthase Ib precursor, mRNA, partial cds.	55°C	35
GBSSII7	R	ATTCTGTGGTACTTCACTTCTAGC			

Fortsetzung Tabelle 38

Primerpaar		Sequenz (5'→3')	Genbankakzession	PCR-Bedingungen	
				Annealing-temperatur	Anzahl Zyklen
GBSSII9	F	GGCAGATTTTCATAATTATTCCAAGT	AF486521 <i>Hordeum vulgare</i> granule bound starch synthase Ib precursor, mRNA, partial cds.	55°C	35
GBSSII9	R	GGCGTCTGTACTGTTTCAGAG			
ADP5	F	ACTCCCTCCGCCTCCTCT	AY634681 <i>Hordeum vulgare</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, complete cds, alternatively spliced.	57°C	35
ADP5	R	AACTTGATCTGATTGCCAGT			
ADP6	F	AATTTATAAAGAAGATGGCATGATCC	AY634681 <i>Hordeum vulgare</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, complete cds, alternatively spliced.	55°C	35
ADP6	R	CTTCGTCAGGGGATACAATCTAGT			
ADP8	F	CAAGACGTCATTGATATTCCTTTTT	AY634681 <i>Hordeum vulgare</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, complete cds, alternatively spliced.	55°C	45
ADP8	R	GGTGATCTCCAGCAAGAATTAGATA			
ADP9	F	CTGTAAGGCAGTACTTGTGGCTATT	AY634681 <i>Hordeum vulgare</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, complete cds, alternatively spliced.	55°C	35
ADP9	R	TAGTTGCACCAGGAATAACTTCACT			
ADP10	F	CCTTATATTGCTAGCATGGGTATCT	AY634681 <i>Hordeum vulgare</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, complete cds, alternatively spliced.	55°C	35
ADP12	R	TCAATTGTACCAATATCTTCCCAGT			
ADP13	F	CTATACGACGGTTACTGGGAAGATA	AY634681 <i>Hordeum vulgare</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, complete cds, alternatively spliced.	55°C	35
ADP13	R	CCATTAGCAACGTGTCCTCTATTAT			
ADP15	F	CATAACACACTGCAACATTGTCAT	AY634681 <i>Hordeum vulgare</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, complete cds, alternatively spliced.	55°C	40
ADP15	R	GCCGCTTCTTGAACATTGTC			
Sbe2b2	F	CCGAGACTTTAAGTACCATCTTGAG	AF064563 <i>Hordeum vulgare</i> cultivar Bomi starch branching enzyme IIb (sbeIIb) gene, nuclear gene encoding plastid protein, partial cds.	60°C	35
Sbe2b2	R	CATTCTCGGTAAGTGATACCTTCAG			

Tabelle 39: Übersicht zu den mit den entwickelten Primern amplifizierten Fragmentgrößen (bp) im Roggenmaterial der KWS Lochow und HYBRO sowie in Gerste, Weizen und Reis

Primerpaar	Fragmentgrößen in bp				
	KWS Lochow	HYBRO	Reis	Gerste	Weizen
Hw3	840	840	-	800	800
sbeI1	800	800	800	800	800
sbeI2	850	850	850	850	-
sbeI3	900	900	850	800	920
sbeI4	850	850	890	850	900
Hw7/Hw6	660	660	660	660	700
Hw8	600	600	-	610	590
GBSSI2	700	700	-	710	690
GBSSI4	850	850	1350	790	880
GBSSII1	320	320	-	350	320
GBSSII2	590	590	585	610	585, 605
GBSSII3	600	600	-	560	550, 620
GBSSII4	480	480	490	610	-
GBSSII5	290	290	290	290	280
GBSSII7	310	310	-	310	310
GBSSII9	435	435	-	435	-
ADP5	310	310	-	610	-
ADP6	795	795	-	795	795
ADP8	790	790	-	790	790
ADP9	690	690	580	690	690
ADP10/ADP12	400	400	980	1000	950
ADP13	650	650	-	650	650
ADP15	900	900	-	810	810
Sbe2b2	610	610	950	610	600, 700

Sequenzierung der PCR-Produkte und Sequenzvergleiche

Die PCR-Produkte einer einzelnen Roggenlinie wurden jeweils mit dem Forward-Primer sequenziert um festzustellen, ob der gewünschte Genabschnitt amplifiziert wurde. Die Sequenzen befinden sich im Anhang A5 (S. 137).

Auf der NCBI-Homepage konnten die Ergebnisse hinsichtlich Sequenzübereinstimmungen geprüft werden. Der Vergleich auf Nukleotidebene (BLASTn) wird anhand von Score und E-Wert definiert. Es konnten große Ähnlichkeiten mit den entsprechenden Stärkegenen bzw. -genabschnitten anderer

Getreidearten, wie Weizen, *Aegilops* und Gerste, gefunden werden. Aufgrund der zahlreichen Übereinstimmungen wird in Tabelle 40 lediglich die jeweilige Genbankakzession aufgeführt, mit der der höchste maximale Score errechnet wurde.

So zeigen beispielsweise die Sequenzen der PCR-Produkte, die aus einem bekannten Genabschnitt mit der Genbankakzessionsnummer AY304541 entwickelt wurden, in der BLASTn Recherche große Homologien zu *sbeI*-Genen mit maximalen Score-Werten von 577 bis 1258 in *Aegilops* und Weizen. Der E-Wert lag, abgesehen von der Hw3-Sequenz ($2e-161$), bei 0,0.

Der höchste maximale Score wurde für den GBSSI4-Abschnitt berechnet. Hier erfolgte die Primerentwicklung direkt aus einer Roggensequenz, mit der das innerhalb des Versuchsmaterials amplifizierte, 750bp große PCR-Produkt eine 100-prozentige Übereinstimmung zeigte. Damit konnte, wie auch für alle anderen PCR-Produkte, nachgewiesen werden, dass es sich um die jeweiligen gewünschten Abschnitte der Stärkebiosynthese handelt.

Bei dem BLASTn-Alignment war auffällig, dass für die Sequenzen, die mit den GBSSII-Primern amplifiziert wurden, die geringsten Score- und höchsten E-Werte berechnet wurden.

Tabelle 40: Zusammenfassung des Alignments der Sequenzen mit bekannten Nukleotidsequenzen in der NCBI-Datenbank (Stand: Oktober 2007)

PCR-Produkt	Im BLASTn identifizierte Ähnlichkeit (Akzessionsnummer)	Max Score	E-Wert
Hw3	AJ237897 <i>Triticum aestivum</i> sbe1 gene, exons 1-14.	577	2e-161
sbeI1	AF525764 <i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> SBE I pseudogene, partial sequence; SBE I pseudogene, complete sequence; and starch branching enzyme I (SBE I) gene, complete cds.	1229	0,0
sbeI2	AF525764 <i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> SBE I pseudogene, partial sequence; SBE I pseudogene, complete sequence; and starch branching enzyme I (SBE I) gene, complete cds.	1236	0,0
sbeI3	AF525764 <i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> SBE I pseudogene, partial sequence; SBE I pseudogene, complete sequence; and starch branching enzyme I (SBE I) gene, complete cds.	1258	0,0
sbeI4	AJ237897 <i>Triticum aestivum</i> sbe1 gene, exons 1-14.	955	0,0
Hw7/Hw6	AF525764 <i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> SBE I pseudogene, partial sequence; SBE I pseudogene, complete sequence; and starch branching enzyme I (SBE I) gene, complete cds.	721	0,0
Hw8	AJ237897 <i>Triticum aestivum</i> sbe1 gene, exons 1-14.	647	0,0
GBSSI2	AB118808 <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>spontaneum</i> GBSSI gene for granule bound starch synthase I, complete cds, strain:OUH643.	1068	0,0
GBSSI4	AY011009 <i>Secale cereale</i> clone 1a granule-bound starch synthase (GBSSI) gene, exons 9 through 14, partial cds.	1369	7e-161
GBSSII1	AF109395 <i>Triticum aestivum</i> granule-bound starch synthase GBSSII mRNA, complete cds.	137	1e-29
GBSSII2	EF221764 <i>Triticum aestivum</i> granule bunch starch synthase II mRNA, partial cds.	494	2e-136
GBSSII3	EF221764 <i>Triticum aestivum</i> granule bunch starch synthase II mRNA, partial cds.	150	4e-33
GBSSII4	EF221764 <i>Triticum aestivum</i> granule bunch starch synthase II mRNA, partial cds.	193	5e-46
GBSSII5	AF109395 <i>Triticum aestivum</i> granule-bound starch synthase GBSSII mRNA, complete cds.	141	1e-30
GBSSII7	EF221764 <i>Triticum aestivum</i> granule bunch starch synthase II mRNA, partial cds.	141	1e-30
GBSSII9	AF109395 <i>Triticum aestivum</i> granule-bound starch synthase GBSSII mRNA, complete cds.	141	2e-30
ADP5	DQ145556S2 <i>Triticum urartu</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, exons 1b, 2 and partial cds, alternatively spliced.	358	7e-96

Fortsetzung Tabelle 40

PCR-Produkt	Im BLASTn identifizierte Ähnlichkeit (Akzessionsnummer)	Max Score	E-Wert
ADP6	DQ145554S2 <i>Aegilops tauschii</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, exons 1b, 2 and partial cds, alternatively spliced.	1068	0,0
ADP8	AY634681 <i>Hordeum vulgare</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, complete cds, alternatively spliced.	888	0,0
ADP9	AY634681 <i>Hordeum vulgare</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, complete cds, alternatively spliced.	1046	0,0
ADP10/ ADP12	AY634681 <i>Hordeum vulgare</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, complete cds, alternatively spliced.	275	8e-71
ADP13	AY634681 <i>Hordeum vulgare</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, complete cds, alternatively spliced.	783	0,0
ADP15	AY634681 <i>Hordeum vulgare</i> ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene, complete cds, alternatively spliced.	535	1e-148
Sbe2b2	AF064563 <i>Hordeum vulgare</i> cultivar Bomi starch branching enzyme IIb (sbeIIb) gene, nuclear gene encoding plastid protein, partial cds.	551	1e-153

Alle 65 Roggeninzuchtlinien der beiden Züchter KWS Lochow und HYBRO konnten anschließend mit den 24 Primerpaaren auf Polymorphismen gescreent werden. Um die Ergebnisse in die Assoziationsstudie zu integrieren wurde gefordert, dass die schwächste Fragmentklasse mit mindestens 4 Genotypen besetzt ist. Allerdings zeigten nur wenige Elternlinien kein Amplifikationsprodukt, so dass die aus dieser Analyse gewonnenen Informationen für eine Verrechnung als unzureichend beurteilt werden mussten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 41 zusammen gefasst.

Tabelle 41: Ergebnisse der Überprüfung der Kandidatengenprimer in den 32 Pollenelterlinien der KWS Lochow und den 23 Saateltern der Hybro

Primerpaar	32 Polleneltern der KWS Lochow:		23 Saateltern der HYBRO:	
	mit Amplifikation	ohne Amplifikation	mit Amplifikation	ohne Amplifikation
Hw3	32	0	22	1
sbeI1	31	1	21	2
sbeI2	32	0	23	0
sbeI3	32	0	23	0
sbeI4	32	0	23	0
Hw7/Hw6	31	1	20	3
Hw8	32	0	22	1
GBSSI2	32	0	23	0
GBSSI4	31	1	21	2
GBSSII1	30	2	21	2
GBSSII2	32	0	20	3
GBSSII3	32	0	23	0
GBSSII4	31	1	23	0
GBSSII5	29	3	23	0
GBSSII7	31	1	22	1
GBSSII9	31	1	23	0
ADP5	32	0	23	0
ADP6	32	0	21	2
ADP8	32	0	21	2
ADP9	30	2	20	3
ADP13	31	1	23	0
ADP15	31	1	22	1
ADP10F/ADP12R	32	0	22	1
sbe2b2	30	2	23	0

Restriktionsverdau von PCR-Produkten

Um nach Polymorphismen in den Restriktionsschnittstellen der PCR-Fragmente zu suchen, wurden diese jeweils mit den Enzymen *HinfI*, *HaeIII*, *HinPI*, *RsaI* und *TaqI* verdaut. Erste Analysen zeigten, dass auch mit diesem Ansatz insgesamt ebenfalls nur sehr wenige Polymorphismen nachweisbar sind, so dass dieser nicht weiter verfolgt wurde. In Tabelle 42 sind die Ergebnisse des Restriktionsverdaus für die PCR-Produkte der Primerpaare GBSSII4 und GBSSII5 beispielhaft dargestellt. Es konnten keine weiteren Polymorphismen zwischen den Linien nachgewiesen werden. Die

Inzuchtlinien, die beim Restriktionsverdau kein Fragment aufwiesen, hatten bereits bei der Testung der Kandidatengenprimer keine Amplifikation gezeigt.

Tabelle 42: Übersicht zu den Ergebnissen des Restriktionsverdaus der PCR-Produkte der Primerpaare GBSSII4 und GBSSII5

Primer-paar	Restriktions-enzym	Fragment-größe in bp	32 Polleneltern der KWS Lochow:		23 Saateltern der HYBRO:	
			mit Fragment	ohne Fragment	mit Fragment	ohne Fragment
GBSSII4	<i>HinfI</i>	480	31	1	23	0
	<i>HaeIII</i>	480	31	1	23	0
	<i>HinPII</i>	480	31	1	23	0
	<i>RsaI</i>	330	31	1	23	0
		150	31	1	23	0
	<i>TaqI</i>	300	31	1	23	0
180		31	1	23	0	
GBSSII5	<i>HinfI</i>	290	29	3	23	0
	<i>HaeIII</i>	290	29	3	23	0
	<i>HinPII</i>	290	29	3	23	0
	<i>RsaI</i>	290	29	3	23	0
	<i>TaqI</i>	290	29	3	23	0

3.4 Datenanalyse

3.4.1 Genetische Diversitätsanalyse

SSR-Analyse

Die Ergebnisse der UPGMA-Cluster-Analyse anhand der SSR-Daten zeigen die Abbildungen 3 und 4 für die 36 Inzuchtlinien der KWS Lochow und 29 Roggenlinien der HYBRO. Beide Dendrogramme trennen den Saat- und Polleneltermaterial voneinander. Im Material der KWS Lochow reichen die genetischen Distanzwerte von 0,15 bis 0,78. Die geringste genetische Distanz wurde zwischen den Roggenlinien LP25 und LP26 ermittelt. Die geringste Ähnlichkeit wurde zwischen LP15 und LP40 berechnet. Im Material der HYBRO konnten mit den Mikrosatelliten-Daten genetische Distanzen von 0,16 bis 0,50 beobachtet werden. Zwischen den Polleneltern HYPE4 und HYPE6 wurde die höchste Ähnlichkeit festgestellt, während die Linien HYL07 und HYPE6 sich genetisch am weitesten voneinander unterschieden.

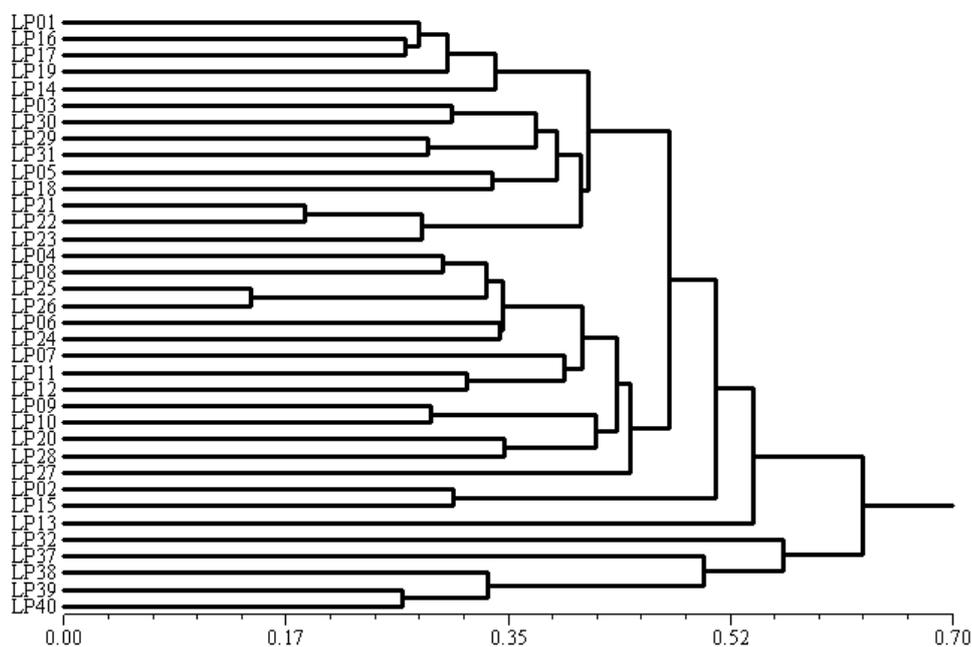


Abbildung 3: Dendrogramm der 36 Roggeninzeuchtlinien der KWS Lochow basierend auf 411 polymorphen SSR-Fragmenten, erstellt mit den Werten der genetischen Diversität nach Nei (1972) und mittels UPGMA-Clusteranalyse (LP01-LP32: Polleneltern; LP37-LP40: Saateltern)

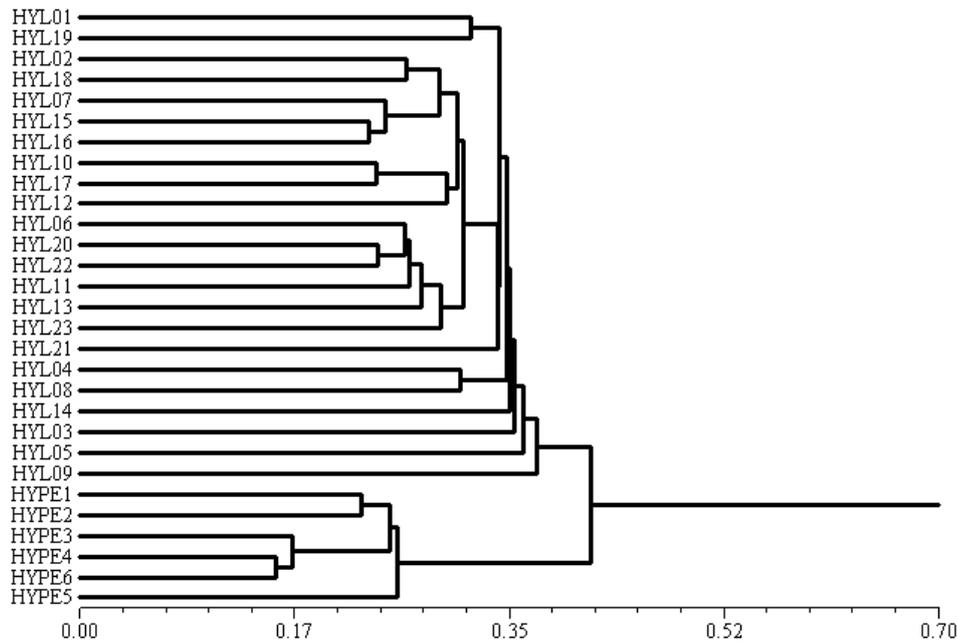


Abbildung 4: Dendrogram der 29 Roggeninzuchtlinien der HYBRO basierend auf 524 polymorphen SSR-Fragmenten, erstellt mit den Werten der genetischen Diversität nach Nei (1972) und mittels UPGMA-Clusteranalyse (HYL01-HYL23: Saateltern; HYPE1-HYPE6: Polleneltern)

AFLP-Analyse

Die Dendrogramme anhand der AFLP-Daten (Abbildungen 5 und 6) gruppierten die Roggeninzuchtlinien der KWS Lochow und HYBRO ebenfalls in Saat- und Polleneltern.

Die genetischen Distanzwerte reichten im Material der KWS Lochow von 0,19 bis 0,68. Die höchste genetische Distanz wurde zwischen den Linien LP03 und LP37 ermittelt. Für die Polleneltern LP25 und LP26 konnte, wie bereits bei der SSR-Analyse, die höchste Ähnlichkeit berechnet werden.

Im Material der HYBRO zeigten die Roggenlinien HYPE5 und HYL18 die höchste genetische Distanz (0,69) während HYPE4 und HYPE6 am engsten genetisch miteinander verwandt waren (0,20).

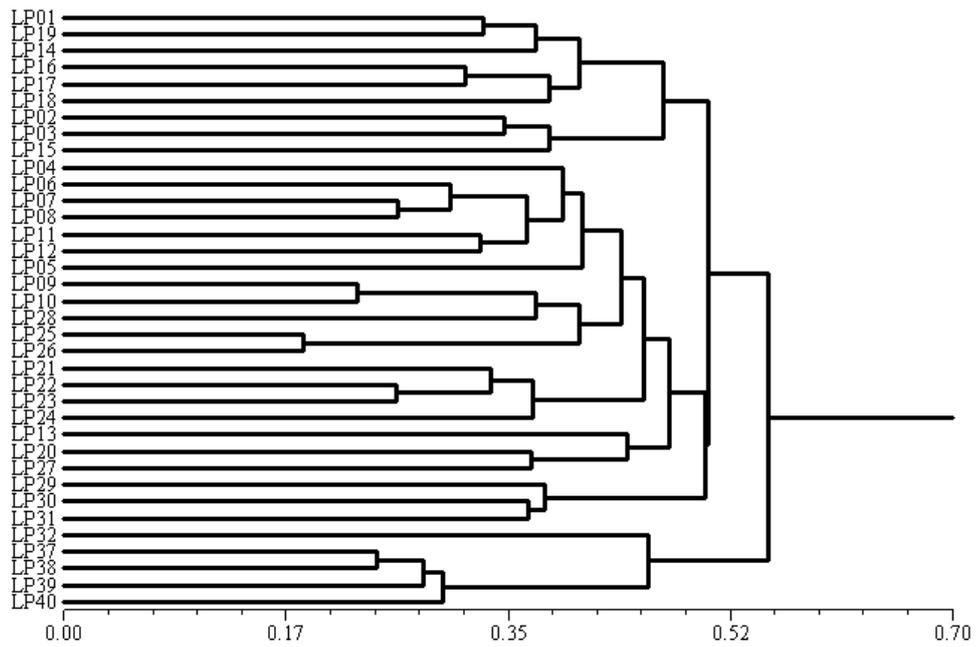


Abbildung 5: Dendrogram der 36 Inzuchtlinien der KWS Lochow basierend auf 1646 polymorphen AFLP-Fragmenten, erstellt mit den Werten der genetischen Diversität nach Nei (1972) und mittels UPGMA-Clusteranalyse (LP01-LP32: Polleneltern; LP37-LP40: Saateltern)

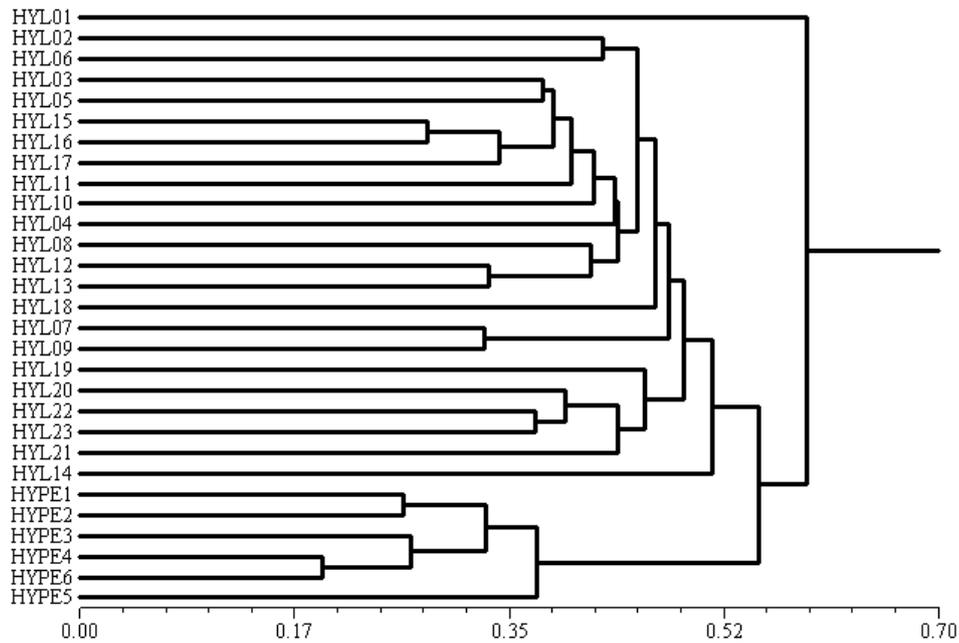


Abbildung 6: Dendrogram der 29 Roggeninzuchtlinien der HYBRO basierend auf 1780 polymorphen AFLP-Fragmenten, erstellt mit den Werten der genetischen Diversität nach Nei (1972) und mittels UPGMA-Clusteranalyse (HYL01-HYL23: Saate Eltern; HYPE1-HYPE6: Pollen Eltern)

Mantel-Test

Mittels Mantel-Test konnten die Ergebnisse der Diversitätsanalyse, basierend auf AFLP- und SSR-Daten, miteinander verglichen werden. Ein signifikanter Zusammenhang wurde für die Distanzmatrizen des KWS Lochow-Materials mit einem Korrelationswert von 0,60 festgestellt. Beim Vergleich zwischen den auf SSR- und AFLP-Markern basierenden Diversitätswerten der HYBRO-Linien konnte mit einem Koeffizient von 0,68 ebenfalls eine positive Beziehung berechnet werden. Eine graphische Darstellung der jeweiligen Ergebnisse zeigen die Abbildungen 7 und 8. Jeder Punkt repräsentiert den Abstand zwischen zwei einzelnen Linien.

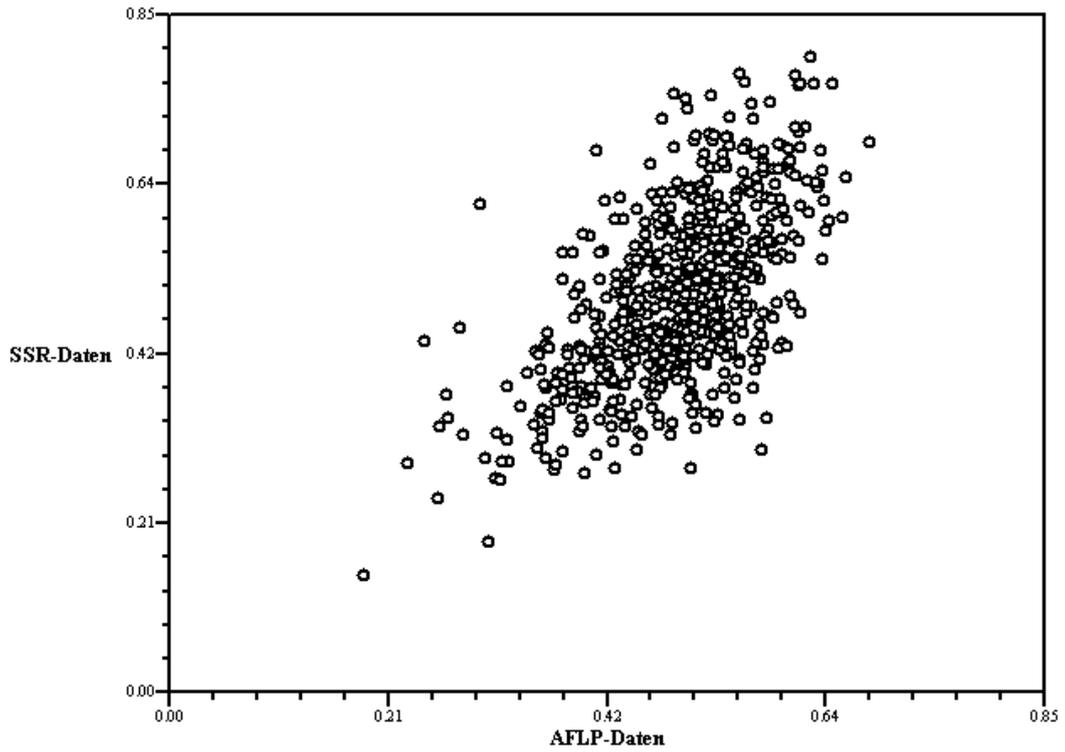


Abbildung 7: Vergleich von zwei Distanzmatrizen basierend auf den SSR- und AFLP-Daten aus den KWS Lochow-Versuchen

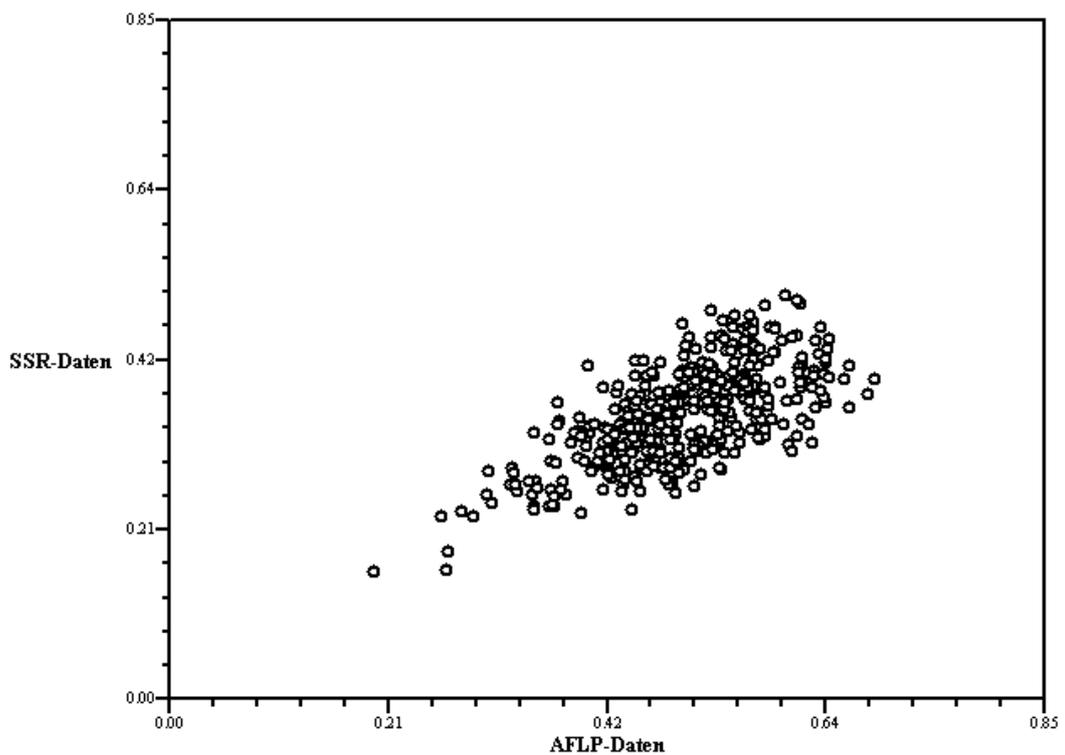


Abbildung 8: Vergleich von zwei Distanzmatrizen basierend auf den SSR- und AFLP-Daten aus den HYBRO-Versuchen

SSR- und AFLP-Analyse

Für das Versuchsmaterial der KWS Lochow und HYBRO wurden die SSR- und AFLP-Daten gemeinsam zur Berechnung genetischer Distanzen verwendet. Die erzielten Dendrogramme sind für das Roggenmaterial der KWS Lochow und HYBRO in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt. Beide zeigen eine deutliche Trennung der Saat- und Polleneltern.

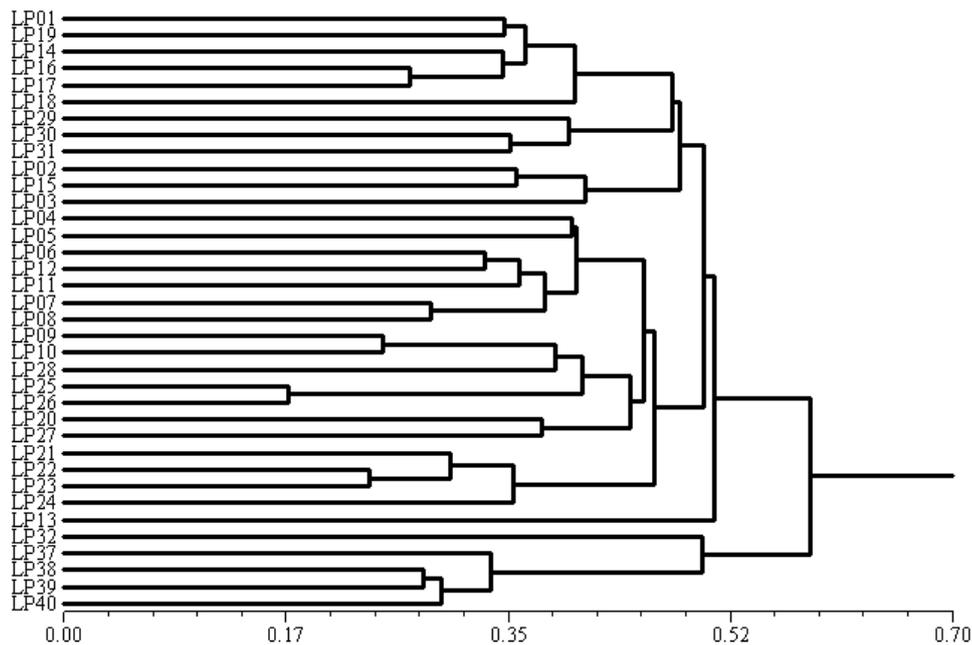


Abbildung 9: Dendrogramm der 36 Inzuchtlinien der KWS Lochow basierend auf 2122 polymorphen SSR- und AFLP-Fragmenten, erstellt mit den Werten der genetischen Diversität nach Nei (1972) und mittels UPGMA-Clusteranalyse (LP01-LP32: Polleneltern; LP37-LP40: Saateatern)

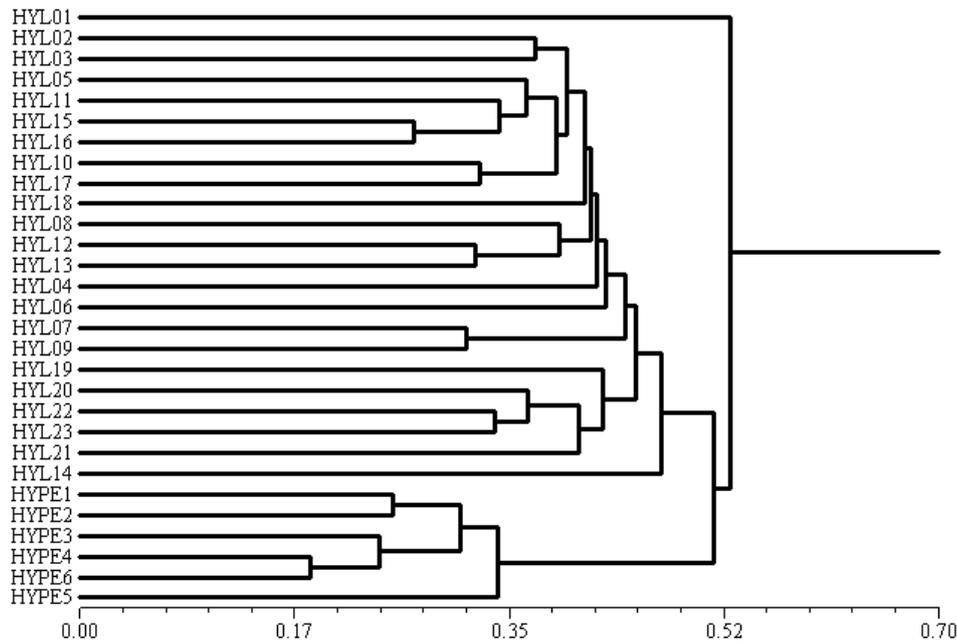


Abbildung 10: Dendrogram der 29 Roggeninzuchtlinien der HYBRO basierend auf 2416 polymorphen SSR- und AFLP-Fragmenten, erstellt mit den Werten der genetischen Diversität nach Nei (1972) und mittels UPGMA-Clusteranalyse (HYL01-HYL23: Saateltern; HYPE1-HYPE6: Polleneltern)

Untersuchung der Beziehung zwischen genetischer Diversität und Merkmalsausprägung

Ziel war es, einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Diversitätsanalyse und der Merkmalsausprägung herzustellen. Je höher die genetische Distanz zwischen den elterlichen Roggeninzuchtlinien, desto größer sollte der Heterosiseffekt für einzelne Eigenschaften der erzeugten Hybriden sein (Becker, 1993).

Zunächst wurden die Werte der Diversitätsanalyse, getrennt nach Kreuzungen mit den jeweiligen Saat- bzw. Polleneltern, für die Versuche beider Züchter betrachtet.

Das Material der KWS Lochow wies hierbei eine mittlere genetische Diversität von 0,57 bis 0,62 auf (Tabelle 43). Die Einzelwerte zeigten eine Spanne von bis zu 0,20 für die Distanz der einzelnen Polleneltern mit dem Tester LP37.

Bei den verschiedenen Kreuzungskombinationen der HYBRO konnten Mittelwerte der genetischen Diversität in einem Bereich von 0,48 bis 0,56 berechnet werden

(Tabelle 44). Einzelwerte wiesen in diesem Material einen maximalen Unterschied von 0,13 im Vergleich mit dem Pollenelter HYPE3 auf.

Tabelle 43: Mittelwert, Minimum und Maximum für die genetischen Distanzwerte der Polleneltern mit den verschiedenen Saateltern im Versuch der KWS Lochow

Saateltern	Mittelwert	Minimum	Maximum
LP37	0,62	0,49	0,69
LP38	0,57	0,49	0,65
LP39	0,59	0,50	0,65
LP40	0,59	0,53	0,65

Tabelle 44: Mittelwert, Minimum und Maximum für die genetischen Distanzwerte der Saateltern mit den verschiedenen Polleneltern im Versuch der HYBRO

Polleneltern	Mittelwert	Minimum	Maximum
HYPE1	0,50	0,45	0,56
HYPE2	0,51	0,45	0,57
HYPE3	0,48	0,42	0,55
HYPE4	0,54	0,47	0,58
HYPE5	0,56	0,51	0,60
HYPE6	0,53	0,49	0,58

Zwischen den mittels Diversitätsanalyse erfassten Daten und den Merkmalswerten wurden Korrelationskoeffizienten berechnet. Für diese Untersuchung wurden die Ergebnisse der Feldversuche über die einzelnen Orte des Erntejahres 2005 gemittelt.

Im Material der KWS Lochow konnte eine positive signifikante Beziehung zwischen der genetischen Distanz und dem Stärkegehalt für die Kreuzungen mit den Saateltern LP37 und LP39 beobachtet werden (Tabelle 45). Des Weiteren zeigte sich eine negative signifikante Beziehung des Proteingehaltes mit LP39 sowie LP40. Die Tausendkornmasse korrelierte mit den Ergebnissen der Kreuzungspartner LP37 und LP38. Im Versuchsmaterial der HYBRO konnten für dieses Merkmal ebenfalls signifikante Zusammenhänge bei HYPE2, HYPE3, HYPE5 und HYPE6 festgestellt werden, die jedoch ein umgekehrtes Vorzeichen hatten (Tabelle 46). Hohe Korrelationskoeffizienten wurden für die Kornbreite im Vergleich der genetischen

Distanzen mit den Merkmalswerten der Kreuzungen von HYPE2, HYPE3 und HYPE5 berechnet.

Tabelle 45: Korrelationskoeffizienten zwischen den Ergebnissen der Diversitätsanalyse für die einzelnen Saateltern der KWS Lochow und den jeweils ermittelten Merkmalen der Hybriden

Merkmal	Genetische Distanz mit dem Saatealter:			
	LP37	LP38	LP39	LP40
Stärkegehalt	0,38*	0,19	0,37*	0,32
Proteingehalt	-0,28	-0,15	-0,51**	-0,49*
Kornertrag	-0,02	-0,04	0,08	0,05
Stärkeertrag	0,12	0,04	0,28	0,18
hl-Gewicht	0,17	0,04	0,11	0,24
Tausendkornmasse	0,42*	0,41*	0,33	0,30
Pflanzenhöhe	-0,15	-0,23	-0,03	0,09

*, ** signifikant bei P = 0.05 und P = 0.01.

Tabelle 46: Korrelationskoeffizienten zwischen den Ergebnissen der Diversitätsanalyse für die einzelnen Polleneltern der HYBRO und den jeweils ermittelten Merkmalen der Hybriden für das Erntejahr 2005

Merkmal	Genetische Distanz mit dem Polleneltern:					
	HYPE1	HYPE2	HYPE3	HYPE4	HYPE5	HYPE6
Stärkegehalt	-0,14	-0,01	-0,07	-0,04	0,18	0,04
Proteingehalt	0,15	-0,02	0,02	0,05	-0,03	0,02
Kornertrag	-0,34	-0,10	-0,06	-0,02	-0,38	-0,23
Stärkeertrag	-0,21	-0,05	-0,05	-0,03	-0,26	-0,08
hl-Gewicht	-0,29	-0,32	-0,16	-0,34	-0,38	-0,18
Tausendkornmasse	-0,29	-0,44*	-0,49*	-0,37	-0,48*	-0,48*
Pflanzenhöhe	-0,13	-0,16	-0,29	-0,10	-0,02	-0,17
Fallzahl	-0,10	-0,30	-0,20	-0,18	-0,22	-0,11
Braunrost	-0,07	-0,21	-0,34	-0,10	-0,07	-0,24
Mehltau	-0,01	0,20	0,20	-0,21	0,11	0,14
Kornbreite	-0,38	-0,52*	-0,64**	-0,35	-0,52*	-0,40
Kornlänge	0,33	0,40	0,23	0,25	0,24	0,16

*, ** signifikant bei P = 0.05 und P = 0.01.

3.4.2 Assoziationsstudie

Die Assoziationsstudie basierte auf dem Zusammenhang der Markerdaten, die an den 32 Polleneltern der KWS Lochow sowie an den 23 Saateltern der HYBRO erfasst wurden, mit den phänotypischen Daten der Hybriden. Der hohe Polymorphiegrad, der innerhalb der AFLP- und SSR-Analysen ermittelt wurde, ermöglichte eine solche Verrechnung.

Loci, bei denen mittels t-Test signifikante Mittelwertsunterschiede für die betrachteten Merkmale zwischen den beiden Markerklassen beobachtet wurden, sind für die Versuche der KWS Lochow und HYBRO in den Tabellen 47, 48 und 49 dargestellt.

Für die Markerklassen ist zunächst vermerkt, von wie vielen Genotypen diese bei den einzelnen Markern besetzt wurden. Waren weniger als 4 Genotypen in einer Klasse vertreten, so wurde die betrachtete DNA-Variation aus der Verrechnung genommen. Des Weiteren wurden nur Marker aufgelistet, die an mindestens 3 Standorten eine Beziehung zu einem der erfassten Merkmale zeigten. Einige Merkmale konnten jedoch nur an ein oder zwei Standorten betrachtet werden (siehe 2.2). Hierfür wurden alle Marker, die mit diesen Daten in Beziehung stehen, aufgeführt.

Die jeweiligen Bestimmtheitsmaße (R^2) geben einen Hinweis darauf, wie viel der phänotypischen Varianz durch den entsprechenden Locus erklärt wird. Insgesamt konnte eine Vielzahl assoziierter AFLP- und SSR-Fragmente in den Versuchen beider Züchter detektiert werden.

Im Material der KWS Lochow wurden für das hl-Gewicht und die Tausendkornmasse die meisten Marker in Assoziation beobachtet. Im Vergleich dazu war die Anzahl Loci für die Merkmale Stärkegehalt, Proteingehalt, Kornertrag, Stärkeertrag und Pflanzenhöhe gering. Für das Bestimmtheitsmaß wurde ein minimaler und maximaler Wert von 16,6 (Pflanzenlänge) und 50,8 % (hl-Gewicht) berechnet. Lediglich für den Mikrosatelliten-Marker LPrm077_186, der eine Beziehung zur Pflanzenlänge zeigte, ist die Position im Roggengenom bekannt. Er befindet sich auf dem Chromosom 6R. Für das hl-Gewicht konnten 15 Marker identifiziert werden, die über alle 6 Versuchsstandorte signifikant mit dem Merkmal assoziiert waren.

Tabelle 47: Darstellung der Ergebnisse der Assoziationsstudie für das Material der KWS Lochow; fett gedruckte Fragmente wurden als signifikant über alle 6 Standorte getestet

Merkmal	Fragment	Markerklasse 1		Markerklasse 0		Differenz	R ²
		n	Mittelwert	n	Mittelwert		
Stärkegehalt (%)	E36M59_380	20	65,94	12	65,11	0,83	33,5
	E37M50_306	10	66,16	22	65,39	0,77	26,8
	E42M57_185	20	65,89	12	65,18	0,71	24,8
	E42M47_169	17	65,31	15	65,98	-0,67	23,2
	P12M62_244	8	65,08	24	65,80	-0,72	21,9
Proteingehalt (%)	E42M60_238	23	9,49	9	9,72	-0,23	19,5
Kornertrag (dt/ha)	E41M49_131	4	92,61	28	89,84	2,77	38,2
Stärkeertrag (dt/ha)	E41M49_131	4	61,47	28	59,10	2,37	37,4
hl-Gewicht (kg/100 l)	LPrm049_155	6	77,68	26	75,72	1,96	50,8
	E42M60_382	17	75,45	15	76,81	-1,36	40,6
	P12M61_91	19	76,64	13	75,28	1,36	38,8
	LPrm132_178	25	75,73	7	77,34	-1,61	38,6
	P17M57_79	9	77,09	23	75,69	1,40	34,5
	P12M55_302	16	75,46	16	76,71	-1,25	34,4
	E42M47_318	16	75,47	16	76,71	-1,24	33,6
	LPrm105_202	13	75,35	19	76,59	-1,24	32,5
	P12M51_294	18	75,56	14	76,77	-1,21	31,4
	P12M48_190	18	75,56	14	76,77	-1,21	31,2
	E32M61_207	5	77,48	27	75,83	1,65	31,2
	LPrm132_158	4	77,65	28	75,86	1,79	30,5
	E41M49_383	5	77,45	27	75,83	1,62	30,1
	E36M59_254	9	77,02	23	75,72	1,30	29,7
	P12M59_147	9	77,00	23	75,73	1,27	28,4
	E32M61_369	9	75,20	23	76,43	-1,23	26,6
	E35M61_151	7	77,13	25	75,79	1,34	26,5
	LPrm084_162	10	75,27	22	76,46	-1,19	26,2
	E36M59_130	11	75,34	21	76,48	-1,14	25,5
	P17M57_113	10	75,30	22	76,45	-1,15	24,7
	E37M48_342	9	76,93	23	75,75	1,18	24,5
	P12M51_312	22	75,73	10	76,87	-1,14	24,2
	P12M49_316	15	75,54	17	76,57	-1,03	22,9
	E42M47_380	14	75,50	18	76,54	-1,04	22,9
	LPrm076_188	22	75,75	10	76,83	-1,08	21,7
	P12M62_387	5	77,24	27	75,87	1,37	21,4
	LPrm046_170	11	75,40	21	76,44	-1,04	21,4
	E35M57_184	13	75,49	19	76,49	-1,00	21,0
	E36M49_227	13	76,68	19	75,68	1,00	21,0

Fortsetzung Tabelle 47

Merkmal	Fragment	Markerklasse 1		Markerklasse 0		Differenz	R ²
		n	Mittelwert	n	Mittelwert		
hl-Gewicht (kg/100l)	LPrm005_243	15	75,57	17	76,55	-0,98	20,9
	E37M48_93	14	75,54	18	76,51	-0,97	20,5
	E42M58_110	12	76,71	20	75,71	1,00	20,4
	LPrm093_203	12	75,47	20	76,45	-0,98	19,7
	E36M57_329	14	76,62	18	75,67	0,95	19,5
	LPrm093_219	13	76,66	19	75,70	0,96	19,4
	E32M61_136	26	75,86	6	77,06	-1,20	19,0
Tausendkornmasse (g)	E32M47_179	20	37,69	12	35,97	1,72	37,5
	LPrm099_193	12	35,98	20	37,69	-1,71	37,3
	P12M62_244	8	35,73	24	37,62	-1,89	37,0
	E42M54_84	14	37,96	18	36,33	1,63	35,7
	E36M59_380	20	37,65	12	36,04	1,61	32,8
	LPrm072_169	20	37,63	12	36,07	1,56	31,4
	P12M49_320	17	36,35	15	37,84	-1,49	30,1
	E42M58_73	13	36,15	19	37,66	-1,51	29,9
	E35M61_340	5	35,36	27	37,36	-2,00	28,6
	E36M48_320	8	35,79	24	37,46	-1,67	28,5
	P12M54_255	12	37,96	20	36,49	1,47	27,6
	E32M49_90	8	35,83	24	37,45	-1,62	26,8
	P12M56_168	10	36,02	22	37,51	-1,49	25,9
	E42M56_307	19	37,61	13	36,21	1,40	25,7
	P12M52_286	19	36,51	13	37,82	-1,31	22,6
	E32M47_153	21	36,59	11	37,91	-1,32	21,2
	LPrm065_182	4	38,61	28	36,82	1,79	19,1
E31M57_168	16	37,63	16	36,46	1,17	18,7	
Pflanzenhöhe (cm)	P12M62_88	28	125,59	4	130,38	-4,79	28,6
	LPrm077_186	22	125,20	10	128,36	-3,16	24,6
	P17M57_264	12	127,97	20	125,11	2,86	21,9
	LPrm076_200	12	127,74	20	125,25	2,49	16,6

Die assoziierten AFLP- und SSR-Marker im Versuch der HYBRO für das Erntejahr 2005 sind in Tabelle 48 dargestellt. Für die Fallzahl konnte kein Marker detektiert werden.

Das Bestimmtheitsmaß wies Werte von 27,8 (Tausendkornmasse, Kornbreite) bis 53,4 % (Stärkeertrag) auf. Die Bonitur von Braunrost erfolgte lediglich in Kleptow und Moosberg. Marker, die an beiden Versuchsstandorten eine Assoziation zu dem Merkmal zeigten, sind in der Tabelle 48 aufgeführt.

Marker, die im Versuchsjahr 2006 ebenfalls eine signifikante Beziehung zum jeweiligen Merkmal gezeigt haben, sind mit einem * versehen.

Tabelle 48: Darstellung der Ergebnisse der Assoziationsstudie für das Material der HYBRO ermittelt mit den phänotypischen Daten aus dem Erntejahr 2005

Merkmal	Fragment	Markerklasse 1		Markerklasse 0		Differenz	R ²
		n	Mittelwert	n	Mittelwert		
Stärkegehalt (%)	E41M53_332	16	61,30	7	62,15	-0,85	40,7
	E37M53_154	16	61,79	7	61,04	0,75	30,9
	SSR1	12	61,87	11	61,22	0,65	27,9
Proteingehalt (%)	SSR2*	10	9,78	13	9,27	0,51	39,2
	P12M58_178	12	9,27	11	9,72	-0,45	31,6
	E37M53_153	7	9,82	16	9,34	0,48	30,6
	E37M53_154	16	9,35	7	9,81	-0,46	28,6
Kornertrag (dt/ha)	E37M53_153	7	96,49	16	99,48	-2,99	34,1
	E32M49_149	18	97,86	5	101,13	-3,27	32,9
Stärkeertrag (dt/ha)	P12M51_192	5	59,96	18	63,31	-3,35	53,4
	E40M56_73	9	59,67	14	62,27	-2,60	44,9
	P12M51_275	6	59,94	17	62,80	-2,86	44,1
	E41M53_92	8	59,79	15	62,36	-2,57	41,9
hl-Gewicht (kg/100 l)	E41M53_214	17	74,28	6	72,55	1,73	50,8
	SSR3	6	72,72	17	74,22	-1,50	38,7
	E42M58_287	13	74,41	10	73,08	1,33	38,6
	P12M47_276	5	72,70	18	74,14	-1,44	31,5
	SSR4	16	74,20	7	72,97	1,23	28,5
Tausendkornmasse (g)	E41M49_84	5	40,00	18	37,76	2,24	39,3
	P12M57_160	5	39,89	18	37,80	2,09	34,4
	P12M47_283	7	36,99	16	38,80	-1,81	32,1
	P17M57_71	15	37,75	7	39,50	-1,75	30,0
	P12M55_158	4	36,56	19	38,61	-2,05	27,8
Pflanzenhöhe (cm)	SSR5	12	155,64	11	149,00	6,64	46,9
	P12M47_186	14	150,20	8	156,64	-6,44	39,5
	P12M62_348	4	146,06	19	153,81	-7,75	36,9
	SSR6	12	155,64	11	149,00	6,64	46,9
	P12M47_186	14	150,20	8	156,64	-6,44	39,5
	P12M62_348	4	146,06	19	153,81	-7,75	36,9
	P12M58_389	10	149,37	13	154,84	-5,47	31,5
	P12M49_95	7	148,51	15	154,32	-5,81	30,0
	E36M57_355	9	155,71	14	150,38	5,33	28,9
	E32M49_149	18	151,10	5	157,37	-6,27	28,6
	P17M57_206	6	148,16	17	153,98	-5,82	27,9

Fortsetzung Tabelle 48

Merkmal	Fragment	Markerklasse 1		Markerklasse 0		Differenz	R ²
		n	Mittelwert	n	Mittelwert		
Braunrost (Bonitur 1-9)	E32M49_157*	17	4,49	6	3,22	1,27	39,8
	SSR7	9	4,83	14	3,73	1,10	36,8
	P12M62_227	13	4,58	10	3,61	0,97	29,7
Mehltau (Bonitur 1-9)	P12M53_272	9	2,20	14	3,01	-0,81	43,2
	E42M60_254	7	2,15	16	2,92	-0,77	36,4
	P12M59_119	5	3,35	18	2,50	0,85	34,3
	E36M59_387	4	3,41	19	2,54	0,87	30,9
	E32M52_269	5	2,06	18	2,86	-0,80	30,7
Kornbreite (mm)	E42M60_342	16	3,08	7	2,99	0,09	29,8
	E37M47_128	9	3,10	14	3,02	0,08	27,8
Kornlänge (mm)	E41M53_214	17	7,47	6	7,72	-0,25	36,3
	E42M58_287	13	7,44	10	7,66	-0,22	35,9
	P12M50_338	11	7,46	12	7,61	-0,15	31,8
	E32M52_220	17	7,59	6	7,37	0,22	29,0

In Tabelle 49 sind die Ergebnisse der Assoziationsstudie für das Erntejahr 2006 der HYBRO dargestellt. Für das Bestimmtheitsmaß wurden Werte von 30,8 (Mehltau) bis 57,1 % (hl-Gewicht) berechnet. Beim Korn- und Stärkeertrag sowie Tausendkornmasse und Pflanzenlänge gab es keine Marker, die mit den Merkmalswerten von mindestens 3 Versuchsstandorten eine Beziehung zeigten. Der Braunrostbefall der Roggenhybriden wurde lediglich in Kleptow und Poznan erfasst. Dementsprechend wurden die Marker aufgelistet, die an beiden Standorten eine Assoziation mit dem Merkmal zeigten. Die Bonitur von Mehltau erfolgte lediglich in Kleptow. Alle Fragmente, die eine Beziehung mit diesem Merkmal aufwiesen, sind in Tabelle 49 aufgeführt.

Marker, die bereits im Versuchsjahr 2005 eine signifikante Assoziation zum jeweiligen Merkmal gezeigt haben, sind mit einem * versehen. Es konnte jeweils für den Proteingehalt und Braunrost ein Locus detektiert werden, der bereits im ersten Versuchsjahr der HYBRO eine Beziehung zu diesen Merkmalen zeigte.

Insgesamt wurde jedoch kein Marker gefunden, der sowohl im Material der KWS Lochow als auch der HYBRO mit einem der Merkmale in Beziehung steht.

Tabelle 49: Darstellung der Ergebnisse der Assoziationsstudie für das Material der HYBRO ermittelt mit den phänotypischen Daten aus dem Erntejahr 2006; mit einem * versehen Fragmente sind bereits mit den Daten aus dem vorherigen Erntejahr als signifikant detektiert worden

Merkmal	Fragment	Markerklasse 1		Markerklasse 0		Differenz	R ²
		n	Mittelwert	n	Mittelwert		
Stärkegehalt (%)	SSR8	9	62,90	14	63,81	-0,91	46,1
	E32M49_266	9	63,10	14	63,97	-0,87	40,0
	P12M62_118	8	63,97	15	63,12	0,85	35,5
Proteingehalt (%)	SSR2*	10	9,06	13	8,41	0,65	44,0
	P12M52_321	5	9,27	18	8,53	0,74	38,9
	E36M61_344	13	8,44	10	9,02	-0,58	35,9
	E37M47_145	10	9,02	13	8,44	0,58	35,9
hl-Gewicht (kg/100 l)	P12M49_145	6	73,72	8	75,10	-1,38	57,1
	E35M61_318	8	75,26	15	73,80	1,46	43,1
	SSR9	5	72,96	18	74,69	-1,73	45,2
Fallzahl (s)	SSR10	9	306,00	14	285,16	20,84	38,3
Braunrost (Bonitur 1-9)	E32M49_157*	17	6,19	6	4,95	1,24	36,6
	E40M47_155	5	4,86	18	6,15	-1,29	34,7
Mehltau (Bonitur 1-9)	P12M62_142*	17	2,91	6	3,87	-0,96	34,2
	E31M57_289	4	4,08	19	2,97	1,11	34,2
	P12M53_272	9	2,64	13	3,51	-0,87	33,6
	SSR11	10	2,69	13	3,52	-0,83	33,2
	P12M52_279	8	2,61	14	3,35	-0,74	32,0
	P12M62_110	8	3,71	15	2,87	0,84	31,6
	E38M53_358	15	2,87	8	3,71	-0,84	31,6
	E37M50_272	11	2,75	12	3,54	-0,79	30,8

4 Diskussion

Bewertung von Roggen als Rohstoff für die Bioethanolherstellung

Aufgrund des stetig steigenden Bedarfs an Energie in Verbindung mit einer weltweiten Verknappung von fossilen Brennstoffen wird intensiv nach Alternativen gesucht. Dabei hat die Entwicklung von Biokraftstoffen eine große Bedeutung erlangt (Festel, 2007). Neben Biodiesel wird verstärkt auch Bioethanol produziert.

Als Rohstoff für die Bioethanolproduktion können zucker-, zellulose- oder stärkehaltige Pflanzen eingesetzt werden. Bei der Verwendung von Getreide sind die Kornmassen gegenüber kohlenhydrathaltigen Spross-, Rüben- und Knollenmassen im Vorteil. Grund dafür sind eine relativ einfache Lagerung und höhere Transportwürdigkeit, bedingt durch hohe Energiedichten und niedrige Wassergehalte (Aufhammer, 1998). Damit wird die ökonomisch wichtige, ganzjährige Auslastung einer Ethanolanlage gewährleistet.

Um eine hohe Produktivität bei der Verwendung von Getreidekörnern zu erreichen, sollten folgende Kriterien erfüllt werden:

- hoher Stärkegehalt
- hohes Ertragspotenzial
- hohes hl-Gewicht
- hohes TKM
- hohe Alkoholproduktivität
- niedriger Proteingehalt
- niedriger Gehalt an löslichem Pentosan
- hohe Enzymaktivität
- geringer Mutterkorn- und Fusariumgehalt
- geringe Kosten der Bioethanolherstellung.

Im Folgenden sollen diese Parameter für Roggen näher betrachtet werden, um eine Bewertung dieses Rohstoffes für die Bioethanolherstellung vorzunehmen. Da bis jetzt keine speziellen Roggensorten dafür gezüchtet wurden, ist von großem Interesse, ob bezüglich der relevanten Hauptmerkmale gute Voraussetzungen für eine züchterische Bearbeitung gegeben sind. In dieser Arbeit war der Ausgangspunkt für die Erfassung der genetischen Variabilität im Roggen eine Population, in die sehr unterschiedliche Herkünfte aus der Genbank Gatersleben, eigenes Material der Professur für

Pflanzenzüchtung in Halle und Züchtermaterial eingingen. Des Weiteren dienten die ausgewählten Genotypen der Erstellung von Kalibrierungskurven zur Bestimmung des Stärke- und Proteingehalts mittels Nahinfrarotspektroskopie. Abschließend wurde die Merkmalsausprägung an den erzeugten Einzelhybriden der KWS Lochow und HYBRO erfasst.

Das Ertragspotenzial einer Kulturpflanze ist immer von großer Bedeutung und auch das wichtigste Kriterium für die Verwendung in der industriellen Bioethanolproduktion (Aufhammer et al., 1993). Die Ergebnisse der 102 Genotypen der Kalibrierungspopulation und der Einzelhybriden bestätigen die signifikant positive Korrelation zwischen Kornertrag und Stärkegehalt im Roggen. Ein hoher Stärkeertrag ist daher über einen hohen Ertrag und über einen hohen Stärkegehalt zu erzielen (Weber et al., 2004). Des Weiteren ist eine gute Kornausbildung wichtig, da Stärke während der Kornfüllungsphase eingelagert wird (Schmitz, 2003). Ein hohes hl-Gewicht und eine hohe Tausendkornmasse sind somit indirekte Merkmale für einen hohen Stärkegehalt.

Im Vergleich der deutschen Hauptgetreidearten ist der Stärkegehalt von Weizen mit 67,5 % am höchsten, gefolgt von Triticale mit 66,5 % und Gerste mit 66,1 %. Roggen weist mit 64,6 % den geringsten Stärkegehalt auf (Schmitz, 2003).

Erwartungsgemäß konnte eine große Variation innerhalb der Kalibrierungspopulation erfasst werden. Der mittels Nahinfrarot-Spektroskopie erfasste Stärkegehalt lag bei 55,1 % und damit unter dem von Schmitz (2003) erfassten Wert. Die Bestimmung nach Ewers erbrachte einen Gehalt von 61,9 %. Bei den untersuchten Hybriden der KWS Lochow konnte jedoch ein deutlich höherer Stärkegehalt im Erntejahr 2005 ermittelt werden. Mittels Nahinfrarottechnik wurden im Durchschnitt 65,6 % beobachtet. Im Material der HYBRO konnten in den Erntejahren 2005 und 2006 lediglich 61,6 und 63,5 % Stärke erreicht werden.

Eigene Untersuchungen zur Stärkezusammensetzung sind nicht erfolgt. Getreidekörner weisen im Durchschnitt ca. 18 - 25 % Amylose und 75 - 82 % Amylopektin auf (Aufhammer, 2003). Wie dieses Verhältnis die Bioethanolausbeute beeinflusst, ist nicht eindeutig geklärt. Fest steht aber, dass ein erhöhter Amylosegehalt von Vorteil ist (Wu et al., 2006), da die unverzweigten Glukoseketten mit einem geringeren Energieaufwand aufgeschlossen werden können.

Das wichtigste Kriterium für die Bioethanolherstellung ist die Alkoholproduktivität. Die direkte Bestimmung ist zeit- und kostenintensiv. Deshalb wird von den Bioethanolanlagen die Stärkegehaltsbestimmung über Nahinfrarot-Spektroskopie als Hauptkriterium bei der Rohstoffauswahl praktiziert.

Es war aber innerhalb der vorliegenden Arbeit möglich Kornpartien von 27 Einzelhybriden auf ihre Alkoholergiebigkeit zu prüfen. Die im Abschnitt 3.2.3 dargestellten Ergebnisse bestätigen die bekannte positive Korrelation mit dem Stärkegehalt. Eine Einzelhybride der HYBRO (HYL04) hatte sowohl die höchste Alkoholausbeute als auch den höchsten Stärkegehalt. Die Variation hinsichtlich Bioethanolausbeute war bei den Hybriden der KWS Lochow und HYBRO mit 1,6 und 1,9 l / 100 kg gering. Eine signifikante Beziehung zwischen Alkoholausbeute und Proteinertrag, Kornertrag und hl-Gewicht konnte nur für das KWS Lochow-Material gefunden werden, deutet aber bei den Versuchen der HYBRO ebenfalls in die gleiche Richtung. Insgesamt war der Probenumfang dieser Untersuchung zu gering. Die Ergebnisse zeigen keine große Variation, um genaue Zusammenhänge mit anderen Merkmalen aufklären zu können.

Rosenberger et al. (2000) konnten in einem Sortenscreening nachweisen, dass nicht immer die Sorten mit dem höchsten Stärkegehalt auch die höchste Alkoholausbeute haben. Auch andere Kornkomponenten können einen Einfluss ausüben, deren Identität noch weitgehend ungeklärt ist. Die höchsten erzielten Alkoholausbeuten je dt Trockenmasse betragen nach Rosenberger et al. (2000) bei Triticale (Sorte ‚Modus‘) 46,0 l, bei Weizen (Sorte ‚Batis‘) 44,7 l und bei Roggen (Sorte ‚Farino‘) 42,8 l.

Die Alkoholproduktivität wird auch von der Enzymaktivität im Getreidekorn beeinflusst. Deshalb ist es für die Bewertung eines Rohstoffes empfehlenswert, dessen α -Amylaseaktivität zu messen. Von den Brennereien wird eine hohe α -Amylaseaktivität gewünscht, da sie zu einer niedrigen Viskosität und Temperatur im Verkleisterungsmaximum führt (Sidio, 2002). Eine hohe Enzymaktivität und damit niedrige Fallzahl ist bei der Brotherstellung unerwünscht und war auf Grund der Auswuchsproblematik bisher kein Zuchtziel. Technisch wird dieses Problem durch die Zugabe von Fremdenzymen gelöst. Unter den Hauptgetreidearten erweist sich Triticale mit einer bereits guten Eigenenzymaktivität als vorteilhaft (Thiemt et al., 2004).

Für die innerhalb der vorliegenden Arbeit untersuchten Hybriden konnte keine Korrelation der Fallzahl mit anderen Merkmalen festgestellt werden. Eine Bestimmung der α -Amylaseaktivität ist aus Kostengründen nicht durchgeführt wurden.

Bei der Brotherstellung aus Roggen hat der Proteingehalt im Vergleich zu Weizen keine Bedeutung. Deshalb gab es beim Roggen bislang keine Züchtung auf Erhöhung des Proteingehaltes. Roggen weist aber genetisch bedingt einen relativ hohen Proteingehalt auf. Für die Produktion von Biokraftstoffen sollte das Ausgangsmaterial allerdings einen geringen Proteingehalt aufweisen. Der Proteingehalt nimmt auf Grund von Verdünnungseffekten während der Kornfüllung ab, während der Stärkegehalt zunimmt. Die Ergebnisse der Proteinanalyse bestätigen die negative Korrelation mit dem Stärkegehalt. Innerhalb der Kalibrierungspopulation hatte die Roggenlinie mit dem höchsten Proteingehalt (R89: 15,5 %) den niedrigsten Stärkegehalt (49,9 %).

Die Untersuchungen von Aufhammer et al. (1996) zeigten, dass der Anstieg des Proteingehaltes um 1 % zu einem geringeren Stärkegehalt und damit bis zu 5 l weniger Alkoholausbeute führen kann. Hohe Proteingehalte können eine unerwünschte Schaumbildung während des Produktionsprozesses hervorrufen (Kaltschmitt und Hartmann, 2001), wirken sich aber andererseits positiv auf das DDGS (Distillers' Dried Grains with Solubles = eiweißreiches Futtermittel, das durch Trocknung der bei der Ethanolproduktion anfallenden Schlempe gewonnen wird) aus (Schmitz, 2003). Darüber hinaus ist Eiweiß auch Nährstoff für die Hefe und damit bedeutend für den Prozess der Fermentation (Sidio, 2002).

Da die Höhe des Proteingehaltes stark von den Anbaubedingungen beeinflusst wird, sind entsprechende Anbauempfehlungen für Bioethanolge treide zu beachten. Insbesondere eine späte N-Gabe sollte mit Vorsicht angewandt werden.

Als Ballaststoffe kommen im Getreide Nicht-Stärke-Polysaccharide vor. Dazu gehört u. a. Pentosan. Im Roggen existieren zwei Pentosanfraktionen: lösliches (Arabinoxylan; 20 – 40 %) und unlösliches Pentosan (60 – 80 %).

Während in der Lebensmittelindustrie für Brotroggen ein hoher Gehalt an löslichem Pentosan gefordert wird, sind in der Tierfütterung ein niedriger Pentosangehalt und hoher Proteingehalt erwünscht. In der Bioethanolproduktion stellen lösliche Pentosane unerwünschte Begleitstoffe dar. Sie besitzen ein hohes Wasserbindevermögen und sind die Ursache für die Einstellung einer hoch viskosen Lösung (Girhammar und Nair, 1992), die die Maischviskosität negativ beeinflusst. Die Zugabe von Enzymen wirkt diesem Prozess entgegen, führt aber zur Steigerung der Herstellungskosten (Schmitz, 2003). Des Weiteren werden Pentosane nicht vollständig vergärt, so dass sie die

Alkoholproduktion verringern (Aufhammer et al., 1993; Kaltschmitt und Hartmann, 2001).

Im Gegensatz dazu schützt unlösliches Pentosan im Quellmaterial die Stärkekörner durch eine schnelle und starke Schwellung und Wasserbindung vor einem enzymatischen Abbau (Seibel und Steller, 1988).

Aufgrund der schlechten Kalibrierung konnte eine Charakterisierung der innerhalb dieser Arbeit untersuchten Einzelhybriden hinsichtlich ihres Pentosangehaltes nicht erfolgen. Im nächsten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wird etwas ausführlicher auf die Probleme bei der Kalibrierung des Pentosangehaltes eingegangen.

Die Bestimmung der Wasserextraktviskosität (WEV) bei Getreide stellt eine indirekte Methode zur Ermittlung des Gehaltes an Nicht-Stärke-Polysacchariden dar (Boros et al., 1993). In Weizen, Triticale und Roggen sind dies hauptsächlich die Arabinoxylane. Mittels nasschemischer Analyse konnte für die Kalibrierungspopulation eine durchschnittliche Wasserextraktviskosität von 6,0 mPa.s ermittelt werden, die damit höher als in anderen Getreidearten ist (Grosjean et al., 1999).

Die Wasserextraktviskosität beim Roggen wird stark durch die löslichen Pentosane beeinflusst, was durch die Ergebnisse der nasschemischen Analyse bestätigt wird. Es konnte eine starke positive Korrelation zwischen dem löslichen Pentosangehalt und der Wasserextraktviskosität nachgewiesen werden. Die Roggenlinie R90 mit der höchsten WEV (31,7 mPa.s) hatte den höchsten Gehalt an löslichem Pentosan (5,5 %). Die Roggenlinie mit der niedrigsten WEV (R51: 2,6 %) zeigte mit 1,6 % einen der niedrigsten Gehalte an löslichem Pentosan. Die Linie mit dem niedrigsten Gehalt an löslichem Pentosan (R54: 1,2 %) zeigte zwar nicht die niedrigste WEV (2,6 %), hatte aber mit 3,5 % eine der niedrigsten Viskositäten.

Die Kornqualität zur Ernte hat für die industrielle Nutzung zunächst eine geringere Bedeutung. Bei der Bioethanolherstellung fallen aber auch Nebenprodukte an, deren sinnvolle Verwertung von großer Bedeutung für die Wirtschaftlichkeit einer Produktionsanlage ist. Somit ist auf einen geringen Mutterkorn- und *Fusarium*-Gehalt zu achten, wenn diese Koppelprodukte als Futter Verwendung finden sollen.

Eine Kontamination mit Mutterkorn kann zwar technisch in einem Reinigungsprozess beseitigt werden, bedingt aber zusätzliche Kosten. Es ist jedoch durch eine geeignete

Sortenwahl vorweg möglich, ein Auftreten zu verringern, da Unterschiede in der Befallstärke bestehen.

Aktuell sind insbesondere Mykotoxine von großer Bedeutung. Sie werden während des Produktionsprozesses nicht abgebaut, sondern um den Faktor 2 bzw. 3 aufkonzentriert. In typischen Befallsjahren zeigt Roggen gegenüber Weizen und Triticale eine deutlich geringere *Fusarium*-Anfälligkeit.

Mutterkorn- und *Fusarium*-Befall wurden am Versuchsmaterial nicht bonitiert. Die untersuchten HYBRO-Hybridkombinationen weisen gegenüber den Blattkrankheiten Braunrost und Mehltau ein gutes Resistenzniveau auf.

Um eine mögliche Beziehung zwischen Kornform und den Inhaltsstoffen aufzudecken wurden mit dem MARVIN Saatkornanalysegerät Länge, Breite und Fläche der Roggenkörner der Kalibrierungspopulation und der Hybriden der HYBRO ermittelt. Nach Dill (1983) resultiert eine hohe Tausendkornmasse in erster Linie aus einer Erhöhung der Kornlänge. In diesen Untersuchungen war sowohl die Länge als auch die Breite der Roggenkörner positiv mit der TKM korreliert. Allerdings war die Korrelation mit der Breite besser. In den Hybriden der HYBRO konnte nur für die Breite ein signifikant positiver Zusammenhang mit der TKM ermittelt werden.

Wie die von der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe in Auftrag gegebene Studie zur Bioethanolgewinnung (Schmitz, 2003) ausweist, sind bisher die unter Einrechnung aller Aufwendungen ermittelten Kosten je t Bioethanol ein kritischer Punkt und somit das Kriterium Nummer eins bei der Rohstoffauswahl.

Unter den Getreidearten sind die Rohstoffpreise bei Roggen am niedrigsten. Roggen kann auch auf schwachen Böden angebaut werden und stellt geringe Ansprüche an Düngung und Pflege, so dass die Erzeugerkosten vergleichsweise niedrig gehalten werden können. Weizen weist einen hohen Stärkeertrag und eine gute Kornausbildung auf, stellt aber hohe Ansprüche an die Böden und ist somit ein teurer Rohstoff. Allerdings ist die Bioethanolherstellung bei Roggen etwas kostspieliger, da viskositätssenkende Enzyme zur Verhinderung der Verschleimung im Konversationsprozess beigegeben werden müssen und ein höherer Dampfbedarf aufgrund schlechterer Möglichkeiten der Schlemperückführung erforderlich ist. (Schmitz, 2003).

Zunehmend gewinnt auch die Bioethanolproduktion aus Zuckerrüben in Deutschland an Bedeutung. So wurde im Herbst 2007 von der Nordzucker AG (Braunschweig, Deutschland) in Klein Wanzleben (Deutschland) mit dem Betrieb einer Anlage begonnen, die eine Jahresproduktionskapazität von bis zu 130.000 m³ haben wird. Ein Hektar Zuckerrüben produziert 4,74 t Bioethanol (fuel 21 GmbH & Co. KG, 2008). Die Gewinnung kann über den Roh- oder Dicksaft erfolgen. Im Vergleich zu Getreide ist bei Zuckerrüben ein höherer Energieeinsatz pro Hektar nötig, der allerdings durch den Ertrag wieder ausgeglichen wird.

Ein weiteres Kriterium bei der Auswahl geeigneter Feldkulturen für die Bioethanolherstellung sind auch die Preise, die für Koppelprodukte erzielbar sind.

Die verwendeten Rohstoffe liefern hierbei unterschiedliche Qualitäten. Bei Weizen, aber auch Roggen, wirkt sich der hohe Proteingehalt günstig auf das DDGS aus.

Aktuell wird die Ausweitung der Bioethanolproduktion aufgrund der fehlenden Akzeptanz in der Kraftstoffindustrie blockiert. Dabei ist immer wieder in der Diskussion, ob die Produktion von Bioethanol in Deutschland aus ökonomischer Sicht sinnvoll ist, da Länder wie Brasilien aus Zuckerrohr hergestellten Alkohol viel kostengünstiger zur Verfügung stellen. Kritisiert wird auch, dass sich Biosprit momentan nur deshalb rechnet, weil er seit Anfang 2004 von der Mineralölsteuer befreit ist. Andererseits ist die Verwendung einheimischer Kulturen zwar teurer als Billigimporte, macht aber aus volkswirtschaftlicher Sicht Sinn. Die Nutzung der Getreideüberschüsse in der EU ist langfristig weit billiger als das bisherige Interventionssystem. Neue Absatzmärkte können den Haushalt dauerhaft von Agrarsubventionen entlasten (Sauter, 2005).

Während sich für die Landwirte neue Absatzmärkte bieten, sehen sich Nahrungsmittelproduzenten mit knapper werdenden Rohstoffangeboten bei gleichzeitig steigenden Preisen konfrontiert. Es bleibt abzuwarten, wie sich diese Marktsituation weiter entwickeln wird.

Die derzeitigen Tendenzen auf dem Kraftstoffmarkt führen nun allerdings dazu, dass Bioethanolroggen als Hauptzuchtziel wieder in den Hintergrund tritt. Aufgrund steigender Rohstoffpreise seit dem Erntejahr 2007 verliert Roggen einen entscheidenden Vorteil. Allerdings wird momentan eine weitere Verwertungsschiene erobert: die Verwendung von Roggen in Biogasanlagen. Hierbei wird die Gesamtpflanze genutzt

und somit sollten Sorten eingesetzt werden, deren Gesamtenergiegehalt hoch ist. Moderne Bioethanolanlagen sind bereits mit Einrichtungen für die Biogaserzeugung kombiniert, da hier die Schlempe als Nebenprodukt sinnvoll, d. h., vor Allem ökonomisch eingesetzt werden kann.

Insgesamt betrachtet lässt sich sagen, dass das anbautechnische insbesondere aber das genetische Potenzial für die Nutzung von Roggen als Energiepflanze noch unzureichend ausgeleuchtet ist. Es besteht noch ein erheblicher Forschungsbedarf bei der Festlegung genauer Zuchtziele für Bioethanolgetreide.

Die Ergebnisse der Kalibrierungspopulation und des evaluierten Zuchtmaterials der KWS Lochow und HYBRO zeigten insgesamt eine hohe Variation innerhalb der untersuchten Zielmerkmale. Eine züchterische Bearbeitung dieser Merkmale scheint sehr gut möglich, da hohe Heritabilitätswerte berechnet werden konnten.

Die beobachteten signifikanten Korrelationen erlauben es, die Anzahl der zu untersuchenden Merkmale während des Selektionsprozesses zu reduzieren. Diese indirekte Selektion ist besonders effizient, wenn das betrachtete Merkmal nur schwierig oder kostenintensiv zu bestimmen ist, erst in späteren Entwicklungsphasen beobachtet werden kann oder stark durch die Umwelt geprägt wird (Wricke und Weber, 1986). Dagegen bedeutet eine Korrelation von Null, dass hier züchterisch noch ganz gut in die gewünschte Richtung selektiert werden kann, ohne dass „feste Beziehungen“ dem im Weg stehen.

Auf Grund der positiven Korrelation des Stärkegehaltes mit dem Zielmerkmal Ethanolausbeute ist eine indirekte Selektion möglich. Diese ist besonders effizient, wenn der Stärkegehalt sehr schnell und ohne hohen Kostenaufwand über Nahinfrarot-Spektroskopie bestimmt wird.

Des Weiteren kann die für das gesamte Versuchsmaterial ermittelte negative Korrelation zwischen Stärke- und Proteingehalt im Zuchtprozess berücksichtigt werden.

Nahinfrarot-Spektroskopie zur Bestimmung von Stärke-, Protein- und Pentosangehalt

Die Nahinfrarot-Spektroskopie hat sich in den letzten Jahren zu einem effektiven Messverfahren mit einer Vielzahl verschiedener Einsatzgebiete entwickelt. Innerhalb der Landwirtschaft wird sie routinemäßig im Labor zur Quantifizierung von Pflanzeninhaltsstoffen angewandt. Moderne Ackerbaubetriebe nutzen diese Technik aber auch bereits auf dem Feld; eingebaut in Mähdreschern beispielsweise zur Proteinbestimmung von Getreidekörnern (Rademacher, 2002). Das Prinzip beruht darauf, dass durch Eigenschwingung von Molekülen der Inhaltsstoffe Infrarotlicht in definierten Wellenlängen absorbiert wird (Wetzel, 1983; Song und Otto, 1995). Von der Intensität des reflektierten bzw. des durch die Probe durchscheinenden Lichtes des Nahinfrarot-Spektrums kann auf die Quantität dieser Inhaltsstoffe geschlossen werden (Dieterle et al., 2003). Hierfür muss das Messinstrument kalibriert werden. Es werden zunächst Proben ausgewählt, die den gesamten zu untersuchenden Wertebereich repräsentieren sollten. Ihre Reflektionsspektren werden erfasst und über eine Referenzmethode die Inhaltsstoffkonzentration bestimmt. Anschließend sind die beiden Ergebnisse rechnerisch miteinander zu verknüpfen, um Kalibrierungskurven für die zu untersuchenden Merkmale zu erstellen.

Es werden zwei Messverfahren unterschieden: Nahinfrarot-Transmissions-(NIT) und Nahinfrarot-Reflektions-(NIR) Spektroskopie. Bei der NIT-Methode werden die zu untersuchenden Proben durchstrahlt. Eine Bearbeitung des Materials ist nicht notwendig und daraus resultiert eine kurze Vorbereitungszeit. Dies wiederum gewährleistet einen hohen Probendurchsatz. Aufgrund der zerstörungsfreien Untersuchung können die Körner weiterhin genutzt werden.

Bei der NIR-Analyse wird die Oberfläche der Proben bestrahlt, so dass eine sorgfältige Oberflächenvorbereitung erfolgen muss (Song und Otto, 1995). Zu untersuchende Getreidekörner sind dementsprechend fein zu vermahlen. Im Vergleich zu einigen nasschemischen Methoden ist diese Analyse aber immer noch schneller, kostengünstiger und auch umweltschonender.

Nachteile der Nahinfrarot-Spektroskopie sind die hohen Gerätepreise sowie die kostspielige und vor allem zeitaufwändige Kalibrierung (Tillmann, 2001; Rademacher, 2002).

Die 102 Genotypen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Kalibrierung genutzt wurden, sind zunächst mit dem Infratec-Gerät (NIT) der MBE in Zörbig auf Protein- und Stärkegehalt untersucht wurden. Als Referenzmethoden wurden die Kjeldahl-Analyse zur Proteinbestimmung sowie die Stärkebestimmung nach Ewers durchgeführt. Die ausgewählten Proben repräsentierten einen weiten Konzentrationsbereich für die beiden Merkmale.

Innerhalb der Kalibrierungspopulation war beim Proteingehalt eine hohe signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen der NIT- und der nasschemischen Analyse zu beobachten ($r = 0,98$). In beiden Untersuchungen zeigten die gleichen Roggenlinien den niedrigsten (R85) und höchsten (R89) Proteingehalt. Die Proteinbestimmung mittels Nahinfrarot-Spektroskopie ist bereits sehr erfolgreich optimiert worden. In erster Linie trägt die Präzision der Referenzmethode dazu bei, die nur einen kleinen Versuchsfehler aufweist. Kjeldahl-Analysen sind bereits seit vielen Jahren zur Bestimmung des Proteingehaltes etabliert.

Vergleichsweise schwach ist die Korrelation zwischen den mittels NIT-Analyse von der Bioethanolanlage Zörbig und den über die nasschemische Analyse vom Julius Kühn-Institut ermittelten Stärkegehalten der Kalibrierungspopulation ($r = 0,72$). Zwei Erklärungen sind denkbar. Entweder ist die indirekte NIT-Analyse nicht stärke-spezifisch genug oder die Ergebnisse der nasschemischen Analyse sind experimentell bedingt fehlerbehaftet. Informationen über die von der Bioethanolanlage verwendete Kalibrierungskurve lagen nicht vor, da es sich um kommerziell genutzte Daten handelt. Deshalb bleibt offen, welche Ursache die schwache Korrelation bedingt. Allerdings war eine exakte Analyse für die Zielstellung der vorliegenden Arbeit unabdingbar, da versucht werden sollte, genetische Ursachen für Schwankungen im Stärkegehalt des Zuchtmaterials zu finden. Deshalb wurden eigene Kalibrierungskurven für weitere Analysen genutzt. Sie haben den Vorteil, dass sie an das entsprechende Versuchsmaterial angepasst werden konnten.

Kalibrierungskurven wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit für ein NIT- (Infratec) sowie ein NIR-Gerät (NIRSystems) zur Bestimmung von Protein-, Stärke- und Pentosengehalt entwickelt. Wie nicht anders zu erwarten, konnten bei der Kalibrierung zum Proteingehalt eine hohe Korrelation mit den Werten der Referenzmethode und ein kleiner Standardfehler ermittelt werden. Die Ergebnisse sind so zu interpretieren, dass mittels Nahinfrarot-Messungen im Durchschnitt 95 (NIR) bzw. 92 % (NIT) der

Variabilität im Proteingehalt zu erklären sind. Die entwickelten Kurven für die Proteinbestimmung mittels Nahinfrarot-Spektroskopie konnten dementsprechend für eine präzise Analyse der Roggenkörner genutzt werden.

Bei den Nahinfrarot-Untersuchungen zum Stärkegehalt wurde ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Referenzmethode für die Spektrometer beider Züchter berechnet. Der Standardfehler war für das Merkmal bei der Validierung der Kalibrierung etwas größer als für den Proteingehalt. Er bewegt sich allerdings noch im Toleranzbereich, und die entwickelten Stärkekurven konnten damit erfolgreich für die Bewertung der Hybridkombinationen herangezogen werden.

Der lösliche Pentosangehalt erwies sich hingegen als schwieriger Parameter. Die Korrelationen zwischen den NIR- bzw. NIT-Schätzwerten und den Ergebnissen der Referenzmethode waren mit $r = 0,71$ und $0,60$ nicht sehr hoch.

Eine wichtige Grundlage für eine erfolgreiche Kalibration ist die Auswahl geeigneter Proben. Ihr Konzentrationsbereich muss größer sein als der zu analysierende Bereich und homogen abgedeckt werden. Die Kalibrierung für das lösliche Pentosan wurde durch eine schiefe Verteilung des Merkmals erschwert. Ca. 90 % der Genotypen lagen in einem Wertebereich von 1 – 2,5 %, während sich der Rest im Bereich 3 – 5 % eingruppierte.

Des Weiteren ist die Genauigkeit der Referenzmethode ein entscheidendes Kriterium, da fehlerbehaftete Laborwerte in den Standardfehler der Nahinfrarot-Analyse einfließen.

Da in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ob Schwankungen im löslichen Pentosangehalt mit Genvariationen assoziiert sind, war eine sehr genaue Analyse notwendig. Die Präzision der NIT- sowie NIR-Methode wurde für diese Zielstellung damit als unzureichend bewertet.

Beim Vergleich der beiden verwendeten Nahinfrarot-Spektrometer (NIRSystems und Infratec) konnte festgestellt werden, dass das NIRSystems-Gerät auffällig bessere Werte in der Validierung lieferte. Beim NIRSystems wird das gemahlene Korngut im Bereich von 1100 – 2500 nm präziser untersucht als ganze Körner beim Infratec im Bereich von 850 – 1050 nm. Diese Feststellung deckt sich mit Erfahrungen aus anderen Arbeiten (Moschner, 2003; Zanella et al., 2005).

Die innerhalb der vorliegenden Arbeit erfolgreich entwickelten Kalibrierungskurven werden zukünftig durch die Integration weiterer Genotypen optimiert und dienen der KWS Lochow und HYBRO zur Beurteilung ihres Zuchtmaterials.

Des Weiteren ist denkbar die NIR-Technik für Untersuchungen zu nutzen, inwieweit sich Unterschiede in der Stärkequalität bzw. -zusammensetzung auf die Bioethanolproduktion auswirken. Beim Julius Kühn-Institut in Groß Lüsewitz (Deutschland) wurde bereits erfolgreich mit NIR-Kalibrationen zur Bestimmung des Amylosegehaltes in Stärkemutanten der Gerste gearbeitet (Wehling, 2006).

Charakterisierung der Roggeninzuchtlinien mittels molekularer Marker

AFLP (Vos et al., 1995)- und Mikrosatelliten (Powell et al., 1996a)-Analysen werden in der Züchtungsforschung routinemäßig durchgeführt, da es mit ihnen möglich ist, einen hohen Polymorphiegrad im zu untersuchenden Material aufzudecken (Gimenes et al., 2002). Für Roggen gibt es zahlreiche genetische Karten, die mit beiden Markertechniken erstellt wurden (Philipp et al., 1994; Senft und Wricke, 1996; Saal et al., 1997; Korzun et al., 2001; Hackauf und Wehling, 2002a, 2002b). Wegen ihrer guten Reproduzierbarkeit werden AFLPs und Mikrosatelliten auch für die markergestützte Selektion genutzt. Von Vorteil ist es, wenn die AFLP-Marker hierfür in sequenzspezifische STS (Sequence Tagged Site)-Marker konvertiert werden (Shan et al., 1999; Meksem et al., 2001). Dies ist insbesondere notwendig, da STS-Marker robuster sind und die AFLP-Methode nicht kommerziell von Züchterhäusern eingesetzt werden kann.

Bei Mikrosatelliten handelt es sich um ein kodominantes Markersystem, welches die Unterscheidung der heterozygoten von homozygoten Genotypen erlaubt. Für die AFLP-Analyse empfiehlt es sich eine dominante Auswertung vorzunehmen. Eine Differenzierung zwischen Heterozygoten und den ein Fragment liefernden Homozygoten kann nur aufgrund der verschiedenen Intensitäten der amplifizierten Fragmente im Gel erfolgen (Vuylsteke et al., 1999) und macht die Auswertung somit sehr fehleranfällig.

In der vorliegenden Arbeit wurden beide Markersysteme dominant ausgewertet. Für die Fragestellung spielte die Unterscheidung von homo- und heterozygoten Genotypen keine Rolle, da die Eltern als Inzuchtlinien nahezu homozygot waren. Des Weiteren

handelt es sich bei Mikrosatelliten-Markern um multiallelische Strukturen, so dass bei verschiedenen Inzuchtlinien die gleichen SSR-Primer verschiedene Fragmente erzeugen können. Somit war lediglich die biallelische Auswertung in Form einer 1/0-Matrix sinnvoll.

Mit der AFLP- und SSR-Analyse konnten in den Polleneltern der KWS Lochow 65 und 94 % der amplifizierten Banden als polymorph detektiert werden. Die Saateltern der HYBRO amplifizierten für die beiden Markersysteme 46 und 86 % der Fragmente als polymorph. Diese Ergebnisse decken sich mit Erfahrungen aus anderen Arbeiten, bei denen über eine SSR-Analyse ebenfalls ein höherer Polymorphiegrad detektiert werden konnte als durch AFLPs (Sojabohne: Powell et al., 1996b; Gerste: Russell et al., 1997). Ursache ist, dass bei den verwendeten Markersystemen unterschiedliche Mechanismen der Allelentstehung vorliegen. Durch das "slippage" der Polymerase während der Replikation der DNA ist es möglich, dass an einem Locus sehr viele verschiedene Mikrosatellitenallele entstehen (Tautz et al., 1989). AFLPs hingegen beruhen auf Insertionen / Deletionen bzw. Punktmutationen in Restriktionsschnittstellen (Vos et al., 1995). Die PCR findet reichlich Bindungsstellen, so dass viele Fragmente amplifiziert werden können, die aber zu einem hohen Anteil monomorph sind.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass bei genomischen SSR-Markern der erzielte Polymorphiegrad höher liegt als bei aus ESTs entwickelten. Dies bestätigen auch Dreisigacker et al. (2004) bei ihren Untersuchungen in Weizen. Ursache hierfür ist, dass bei EST-SSRs weniger Einzelnukleotidunterschiede in der Umgebung des SSRs auftreten. Da damit aber auch die Auswertung und Bestimmung der Allelgröße erleichtert wird, hat dieser Markertyp einen entscheidenden Vorteil. Genomische Mikrosatelliten zeigen oftmals Stotterbanden in der Gelelektrophorese, die nicht eindeutig zuzuordnen sind.

Die AFLP- und Mikrosatelliten-Daten wurden für die Berechnung der genetischen Distanz zwischen den Inzuchtlinien genutzt. In der Roggenzüchtung sind derartige Analysen eine wichtige Methode, um geeignete Kreuzungspartner zu selektieren. Für einen möglichst hohen Heterosiseffekt in den Nachkommen werden dabei genetisch weit voneinander entfernte Eltern aus zwei verschiedenen Pools gewählt.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass sowohl AFLPs als auch Mikrosatelliten erfolgreich zur Charakterisierung der Roggeninzuchtlinien eingesetzt werden konnten. Beide trennten den Saat- und Pollenelterpool voneinander.

Mittels Mantel-Test wurde nachgewiesen, dass die mit den zwei Markersystemen erzielten Diversitätswerte gut miteinander übereinstimmen (KWS Lochow: $r = 0,60$; HYBRO: $r = 0,68$). In anderen Kulturen wurden stärkere Abweichungen zwischen den Distanzmatrizen verschiedener Analysemethoden gefunden (Apfel: Boritzki, 2001; Erbse: Lu et al., 1996), so dass die Vermutung nahe liegt, dass jeweils unterschiedliche genetische Informationen gesammelt wurden.

Wie bereits erwähnt sind die Mechanismen, die der Markerentwicklung zugrunde liegen, nicht identisch (Boritzki, 2001; Bolibok et al., 2005). Des Weiteren wurden die verwendeten Mikrosatelliten-Marker größtenteils bereits kartiert und sind gleichmäßig über das Genom verteilt. Hingegen sind AFLPs sogenannte anonyme Marker, die oftmals in Clustern außerhalb des Centromerbereiches liegen und damit teilweise eine nur unzureichende Charakterisierung des Genoms ermöglichen.

Bolibok et al. (2005) untersuchten 30 Roggeninzuchtlinien jeweils mit ISSRs (Intersimple Sequence Repeats; Zietkiewicz et al., 1994), SSRs und SAMPLs (Selectively Amplified Microsatellite Polymorphic Locus; Witsenboer et al., 1997). Die getrennte Verrechnung der verschiedenen Markerdaten ergab Unterschiede bezüglich der durchschnittlichen genetischen Distanzwerte zwischen den Genotypen. Bei Gesamtbetrachtung der Ergebnisse kamen sie zu dem Schluss, dass eine Analyse unter Verwendung verschiedener Markersysteme von Vorteil ist.

In verschiedenen Kulturen, wie Mais (Smith et al., 1990), Raps (Diers et al., 1996), Rübsen und Kohl (Abel, 2006) konnte eine Korrelation zwischen Heterosis und genetischer Distanz beobachtet werden. Da für die untersuchten Roggeninzuchtlinien keine Informationen bezüglich ihrer Leistung zur Verfügung standen, konnte für die erzeugten Hybriden die Heterosis nicht berechnet werden. Diese kann allerdings mit Hilfe der molekularen Daten geschätzt werden. Somit wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, einen Zusammenhang zwischen der genetischen Diversität der Kreuzungspartner und der Merkmalsausprägung der Hybriden zu finden.

Hierzu wurden die Distanzwerte, berechnet aus der AFLP- und Mikrosatelliten-Analyse, mit den Merkmalen, gemittelt über alle Standorte des Erntejahres 2005, korreliert. Eine Beziehung dieser Daten wäre zu erwarten, da nach Becker (1993)

genetisch weit voneinander entfernte Kreuzungspartner Hybriden mit einer hohen Leistung hervorbringen müssten und umgekehrt.

Im Material der KWS Lochow konnte eine Beziehung zwischen der genetischen Distanz und dem Stärkegehalt sowie dem Proteingehalt und der Tausendkornmasse für verschiedene Kreuzungen beobachtet werden (Tabelle 43).

Hohe Korrelationskoeffizienten wurden für die Tausendkornmasse und die Kornbreite im Vergleich der genetischen Distanzen mit den Merkmalswerten für Kreuzungen der HYBRO beobachtet (Tabelle 44).

Für die meisten Merkmale gelang es jedoch nicht, einen positiven Zusammenhang ihrer Ausprägung mit der genetischen Diversität herzustellen. Es existieren Arbeiten, in denen verschiedene Autoren berichten, dass auch bei anderen Kulturarten wie beispielsweise Raps (Jain et al., 1994) und Arabidopsis (Barth et al., 2003; Meyer et al., 2004) keine Beziehung zwischen Heterosis und genetischer Distanz beobachtet werden konnte. Knaak (1996) stellte in seinen Untersuchungen bei Raps fest, dass die Beziehung häufig nur gefunden werden kann, wenn nahe verwandte Genotypen untersucht worden sind. Nach Charcosset und Essioux (1994) empfiehlt sich zur Berechnung genetischer Distanzen die Verwendung von molekularen Markern, die mit QTLs gekoppelt sind, um die Korrelation mit der Heterosis zu erhöhen. Somit könnten Mikrosatelliten- und AFLP-Fragmente, die in dieser Arbeit eine Assoziation zum Phänotyp zeigten für weitere Untersuchungen herangezogen werden.

Entwicklung von Primern aus Kandidatengen der Stärkebiosynthese

Die vergleichende Genomanalyse hat eine große Übereinstimmung in der Abfolge der Gene auf den Chromosomen der verschiedenen *Poaceae*-Arten ergeben, die als Synthenie bezeichnet wird (Devos und Gale, 2000). Dieses Phänomen ermöglichte in der vorliegenden Arbeit einen Kandidatengenansatz. Da die Stärkebiosynthese bei verwandten Arten des Roggens bereits intensiv untersucht worden ist, konnten die zugrunde liegenden Gen-Informationen genutzt werden, um einen möglichst schnellen Zugriff auf die interessierenden Regionen im Genom zu bekommen.

Von Interesse waren Gene, die an der Produktion von ADP-Glucose beteiligt sind (Thorbjørnsen et al., 1996), und Gene, die die Verzweigung der Stärke und damit die Bildung von Amylose und Amylopektin kontrollieren (Sun et al., 1998; Domon et al.,

2002; Patron et al., 2002; Mutisya et al., 2003). Abbildung 11 zeigt eine vereinfachte Darstellung des betrachteten Bereiches der Stärkebiosynthese. Die Auswahl der Gene erfolgte im Hinblick darauf, dass neben einem hohen Stärkegehalt auch die Zusammensetzung dieses Inhaltsstoffes d.h. das Verhältnis von Amylose zu Amylopektin bei der Bioethanolherstellung eine Rolle spielt.

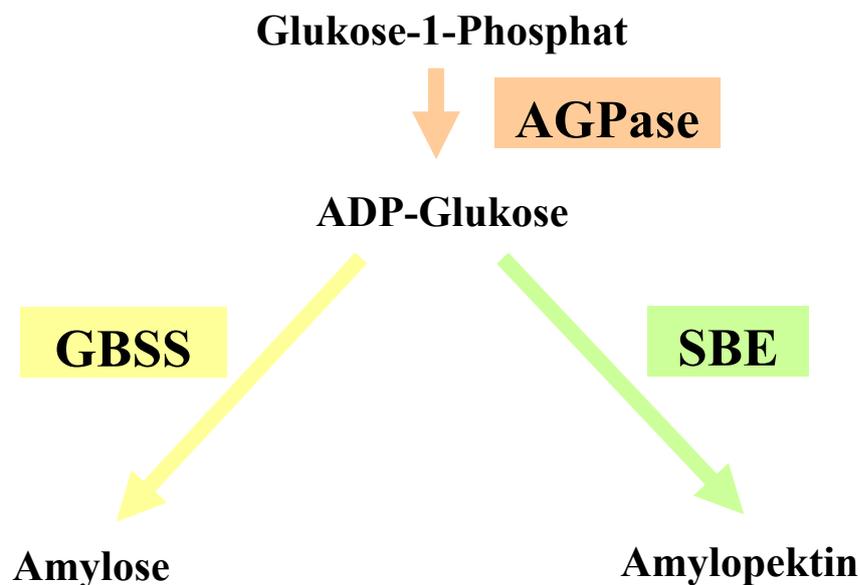


Abbildung 11: Vereinfachtes Schema der Stärkebiosynthese (ADP...Adenindiphosphat, AGPase...ADP-glucose pyrophosphorylase, SBE...starch branching enzyme, GBSS...granule bound starch synthase)

Auf der NCBI-Homepage veröffentlichte Sequenzen aus Gerste, Weizen, Reis und Roggen wurden zur Primerentwicklung herangezogen. Für die praktische Züchtung war zunächst zu prüfen, ob diese Gene auch im Roggen zu finden sind. Da die Primerentwicklung bereits in konservierten Bereichen von Genen der Stärkebiosynthese erfolgte, konnten im Roggen erfolgreich die Mehrzahl der Abschnitte dargestellt werden. Mit der anschließenden Sequenzierung der PCR-Fragmente und dem Blastn bei NCBI wurde das Vorhandensein der entsprechenden Stärkegene im Roggen nachgewiesen.

Das Fehlen von Amplifikationsprodukten bei einigen Primern ist nicht zwangsläufig darauf zurückzuführen, dass komplementäre Sequenzen gar nicht vorhanden sind.

Selbst geringe Abweichungen in den Primerbindungsstellen können dazu führen, dass sich diese nicht anlagern.

Es zeigte sich deutlich die stärkere Verwandtschaft von Roggen zu Gerste, aber auch Weizen. Eine Amplifikation der im Roggen funktionierenden Primerpaare kam in Reis seltener vor und aus Reis entwickelte Primerpaare konnten im Roggen nicht erfolgreich eingesetzt werden. Damit wird die weitere genetische Entfernung der beider Kulturen bestätigt.

Die Tatsache, dass nur sehr wenige Polymorphismen mit den Primerpaaren in den Saat- und Polleneltern beider Züchter gefunden worden, könnte darauf hindeuten, dass die amplifizierten Abschnitte für die Stärkebiosynthese wichtig bzw. essentiell an ihr beteiligt sind. Das bestätigen auch die hohen Sequenzübereinstimmungen mit anderen Getreidearten im Vergleich (Blastn) auf der NCBI-Homepage.

Wie zu erwarten war, zeigte das PCR-Produkt GBSSI4, dessen Primer direkt aus einer bereits bekannten Roggensequenz entwickelt wurden, die höchsten Score-Werte und eine 100-prozentige Übereinstimmung mit der Sequenz der zugrunde liegenden Genbankakzession.

Auffällig war, dass für die Sequenzen, die mit den GBSSII-Primern amplifiziert wurden, die geringsten Score- und höchsten E-Werte berechnet wurden. Wahrscheinlich gibt es in diesem Bereich eine größere Variation d.h. diese Genabschnitte sind nicht so hoch konserviert. In den untersuchten Roggenlinien konnten jedoch auch keine verwertbaren Polymorphismen mit den GBSSII-Primern nachgewiesen werden

Der Kandidatengenansatz erfordert gravierende Unterschiede im zu untersuchenden Merkmal. Es kann angenommen werden, dass die untersuchten Hybriden eine zu geringe Variation im Stärkegehalt aufwiesen. Zwei unterschiedliche Phänotypenklassen, wie sie in klassischen Assoziationsstudien Verwendung finden, konnten somit nicht identifiziert werden. Ebenso ist fraglich, ob der über Nahinfrarot-Spektroskopie ermittelte Stärkegehalt das Merkmal genau beschreibt.

Eine Analyse der Stärkezusammensetzung konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden. Es wird aber vermutet, dass sich die untersuchten Roggenlinien bezüglich des Verhältnisses von Amylose zu Amylopektin nur unwesentlich unterscheiden und somit keine Polymorphismen mit den entwickelten Primerpaaren detektiert werden konnten. Somit müsste zunächst geprüft werden, ob in

Material, das eine höhere Variation im Stärkegehalt aufweist und dessen Stärkezusammensetzung bekannt ist, ebenfalls keine Unterschiede nachweisbar sind.

Des Weiteren könnte eine Sequenzierung und anschließender Vergleich über alle Roggenlinien klären, ob es Einzelnukleotidunterschiede gibt, die weder mittels PCR noch Restriktionsverdau nachweisbar waren. Solche sogenannten SNPs (single nucleotide polymorphisms) würden dann beispielsweise für die Entwicklung von CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence; Konieczny und Ausubel, 1993) oder von Markern für die Pyrosequenzierung genutzt werden.

Außerdem wurden die PCR-Fragmente lediglich in einem Agarosegel betrachtet. Mit Hilfe anderer Detektionssysteme, wie beispielsweise der Kapillargelelektrophorese, könnten vielleicht noch unbekannte Polymorphismen aufgedeckt werden.

Da die Primerentwicklung lediglich in den Exonbereichen der jeweiligen Gene erfolgte, wäre es möglich, um Variation zu untersuchen, auch Promotor- oder Intron-Sequenzen in Betracht zu ziehen. Allerdings ist zu beachten, dass Introns zwar Variation bieten, aber es fraglich ist, ob sich dahinter eine Funktion verbirgt.

Dabei könnten nun noch weitere Gene der Stärkebiosynthese, die beispielsweise an der Regulation beteiligt sind, getestet werden. Von Bedeutung sind auch die Waxy-Gene (Yamamori und Quynh, 2000; Bao et al., 2002). In Kulturen, wie beispielsweise Weizen, Reis, Kartoffeln und Mais, existieren sogenannte Waxy-Typen. Diese zeichnen sich durch einen erhöhten Amylopektingehalt aus, der entweder auf das mutationsbedingte Fehlen der GBSS zurückzuführen ist (Weizen: Nakamura et al., 1995), oder dadurch dass diese durch Antisense-RNA spezifisch runterreguliert werden (Kartoffeln: Visser et al., 1991; Reis: Shimada et al., 1993). Hingegen weisen Amylo-Typen, die auch bei Mais bereits erfolgreich entwickelt wurden, im Verhältnis der Stärkezusammensetzung mehr Amylose auf (Aufhammer, 2003). Es existieren bereits Waxy-Roggen mit einem erhöhten Amylopektingehalt, die aber bisher keine große wirtschaftliche Bedeutung erlangten.

Des Weiteren ist bekannt, dass auch andere Korninhaltsstoffe wie der Pentosan- oder Proteingehalt einen Einfluss auf die Alkoholausbeute haben, und somit sollten Kandidatengene aus verschiedensten Bereichen für die vorliegende Fragestellung genutzt werden.

Grundlegend müsste schließlich auf RNA- oder Proteinebene geprüft werden, ob die ausgewählten Gene nicht nur strukturell vorhanden, sondern auch aktiv sind.

Des Weiteren können interessante Kandidatengenprimer in einer für das Merkmal phänotypisch spaltenden Kartierungspopulation getestet werden. Da es sich in der Regel, wie auch bei der Stärke, um quantitativ vererbte Merkmale handelt, würde sich eine QTL-Analyse anschließen, um funktionelle Regionen aufzudecken (Lander und Botstein, 1989).

Im Anschluss wäre es möglich, die gewonnenen Informationen auf verwandte Arten des Roggens wie beispielsweise Triticale zu übertragen. Die Weizen-Roggen-Kreuzung wurde bezüglich der Stärkebiosynthese bisher auch nur wenig untersucht, ist aber aufgrund eines hohen Stärkegehaltes und einer hohen Eigenzymaktivität ebenfalls gut für die Bioethanolproduktion geeignet (Thiemt et al., 2004).

Assoziationsstudien bei Roggen

Ursprünglich finden Assoziationsstudien in der Humangenetik Anwendung, um DNA-Variationen mit bestimmten Krankheiten in Verbindung zu bringen. Hierfür wird mit Patienten und einer Gruppe gesunder Menschen gearbeitet.

In den letzten Jahren gewinnen Assoziationsstudien immer größere Bedeutung in der Pflanzenzüchtung. Verschiedene Markersysteme kommen dabei zum Einsatz. Die gewonnene genetische Information wird auf ihre Beziehung zum Phänotyp hin untersucht. Ist ein Marker mit einem Merkmals-Gen gekoppelt bzw. assoziiert, so ist ein Kopplungsungleichgewicht festzustellen, wenn noch nicht ausreichend Zeit vergangen ist, um das Gleichgewicht zu erreichen. Nach Kimura (1956) ist ein Kopplungsungleichgewicht eine nicht-zufällige Assoziation von Allelen gekoppelter Genloci.

Der Vorteil von Assoziationsstudien liegt darin, dass zunächst keine Kartierung notwendig ist und ein großer Umfang an unterschiedlichen Genotypen getestet werden kann. Damit wird verhindert, dass bei Untersuchungen innerhalb von Kartierungspopulationen Marker gefunden werden, die spezifisch polymorph für die jeweilige Kreuzung sind, sich aber nicht universell einsetzen lassen.

Innerhalb von Assoziationsstudien kann jedoch kein Kopplungsmaß geschätzt werden und eine Kartierung ist somit nicht möglich. Bedingt durch die Auswahl der zu untersuchenden Genotypen können „falsche“ Assoziationen berechnet werden. Deshalb ist repräsentatives Material für die Analysen auszuwählen.

In Kulturen, wie beispielsweise Gerste (Comadran et al., 2008), Kartoffel oder Deutsches Weidelgras (Skot et al., 2002) konnten bereits erfolgreich assoziierte Marker für zahlreiche Merkmale detektiert werden. Im Roggen gab es bislang keine Erfahrungen mit dieser Methode.

In der Hybridzüchtung werden bei Roggen ähnlich wie auch bei Mais getrennte Genpools für Saat- und Polleneltern geführt, die für enge Kopplungen noch nicht im Gleichgewicht sind. Für diese Situation haben Vuylsteke et al. (2000) bei Mais nach entsprechenden Voruntersuchungen in den Elternpools vorgeschlagen, nach Assoziationen zu suchen, dort eine Selektion durchzuführen und nur für die selektierten Eltern die Hybriden experimentell zu erzeugen. Die vorliegende Arbeit bot die Möglichkeit dieses Konzept erstmals auch bei Roggen auf seine Brauchbarkeit zu erproben.

AFLP- und SSR-Markerdaten wurden an den elterlichen Linien erfasst und mit den phänotypischen Merkmalen der Einfachhybriden auf Assoziation geprüft. Prinzipiell werden Fragmente, in denen sich die Eltern unterscheiden müssen, und Merkmale nur als assoziiert bewertet, wenn die Mittelwerte der zwei betrachteten Markerklassen signifikant verschieden sind. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mittels t-Test untersucht. Zahlreiche mit einem Merkmal gekoppelte DNA-Variationen konnten somit gefunden werden. Da die Anzahl untersuchter Marker sehr groß war, wird angenommen, dass auch falsch positive Assoziationen erfasst wurden.

Der wichtigste Aspekt bei der Durchführung einer Assoziationsstudie ist die Auswahl geeigneter Testindividuen. Im Bezug auf den Stärkegehalt erwiesen sich die untersuchten Roggenlinien der KWS Lochow und HYBRO als ungeeignet, da keine große Variation im Material auffindbar war. Die statistische Verrechnung der Feldversuche zeigte, dass beispielsweise für die Tausendkornmasse und das hl-Gewicht im Vergleich zu dem Stärkegehalt im Material der KWS Lochow eine höhere genetische Variation vorhanden ist. Dies könnte ein Grund sein, dass für diese beiden Merkmale mehr assoziierte Marker gefunden werden konnten.

Von besonderem Interesse sind die Marker, die mit den jeweiligen Merkmalswerten mehrerer Orte (und Jahre) in Beziehung stehen. Sie beschreiben die Hybriden bzw. deren Phänotyp auch, wenn dieser veränderten Umweltbedingungen ausgesetzt ist und könnten somit als Selektionsmarker eingesetzt werden.

Innerhalb der Versuche der HYBRO konnte jeweils für den Proteingehalt und für Braunrost ein Marker gefunden werden, der in beiden Versuchsjahren eine Assoziation zum entsprechenden Merkmal zeigte.

Marker, die sowohl im Material der KWS Lochow als auch HYBRO mit einem der Merkmale in Beziehung stehen, wurden nicht beobachtet.

Um die AFLP-Informationen kommerziell nutzen zu können, muss eine Konvertierung in STS-Marker erfolgen. Die verwendeten Mikrosatelliten boten hingegen den Vorteil, dass sie größtenteils bereits in umfangreichen Studien kartiert wurden. Somit konnte eine chromosomale Zuordnung einiger mit bestimmten Merkmalen assoziierter Marker erfolgen. Diese befinden sich allerdings nicht in bereits definierten QTL-Regionen.

Im Rahmen des Kandidatengenansatzes sollte nach Einzelnukleotidunterschieden in den entsprechenden Genen gesucht werden. Diese hätten anschließend ebenfalls mit dem Phänotyp assoziiert werden können. Gegenüber der Verwendung anderer Markersysteme besteht der Vorteil, dass direkt in dem mit dem Merkmal in Verbindung stehenden Genbereich nach Assoziationen gesucht wird.

Um die gefundenen Assoziationen zu prüfen, können nur weitere Untersuchungen in einem größerem Materialumfang folgen. Vor Allem muss geprüft werden, ob mit den gefundenen Markern eine Vorselektion innerhalb der Inzuchtlinien wirklich möglich ist. Des Weiteren ist zu beachten, dass im Rahmen einer Assoziationsstudie lediglich eine Hypothese aufgestellt werden kann. Über die Funktion einzelner Gene bzw. Genabschnitte kann keine Aussage getroffen werden. Wird für eine genetische Variation keine Assoziation festgestellt, kann es auch möglich sein, dass sie sich für das betreffende Merkmal neutral verhält oder aufgrund eines Gleichgewichts mit einer weiteren Genvariation ihre Funktion nicht phänotypisch zum Tragen kommt (Gambaro et al., 2000).

Eine Assoziation zwischen Merkmal und Marker sollte letztendlich in einer für das Merkmal phänotypisch spaltenden Kartierungspopulation getestet werden, bevor sie zur Selektion eingesetzt wird.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Bewertung von Roggen als Rohstoff für die Bioethanolproduktion. Ausgangspunkt war die Erfassung der genetischen Variabilität im Roggen hinsichtlich der Hauptmerkmale Kornertrag, Stärkeertrag, Stärkegehalt, Proteingehalt und Pentosengehalt. Für die Evaluierung wurde eine Kollektion, bestehend aus 102 Roggenlinien und -sorten, zusammengestellt. Dieses Material konnte erfolgreich für die Entwicklung von Kalibrierungskurven zur Bestimmung von Stärke- und Proteingehalt mittels Nahinfrarot-Spektroskopie herangezogen werden. Die Kalibrierungskurven wurden im Projekt für die Evaluierung des Versuchsmaterials genutzt, sollen aber zukünftig durch die Integration weiterer Roggengenotypen optimiert werden.

Elterliche Roggenlinien der Züchter KWS Lochow GmbH (32 Pollen- und 4 Saateltern) und HYBRO Saatzucht GmbH & Co. KG (23 Saat- und 6 Polleneltern) wurden mit molekularen Markern (AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) und Mikrosatelliten = SSR (Simple Sequence Repeat)) auf DNA-Polymorphismen gescreent. Aus den Elternlinien wurden in faktoriellen Kreuzungsplänen Hybriden erzeugt und zunächst einjährig für das Erntejahr 2005 zur Erfassung von agronomischen Merkmalen an 6 (KWS Lochow) bzw. 5 (HYBRO) Standorten in Deutschland und Polen angebaut. Im Mittel wurde für das Material ein Stärkegehalt von 65,6 % (KWS Lochow) und 61,6 % (HYBRO) gefunden. Die Spannweite im Stärkegehalt betrug 3,1 bzw. 2,6 %. Es konnten für den Stärkegehalt als auch für weitere agronomische Merkmale zahlreiche assoziierte Marker gefunden werden.

Die Versuche der HYBRO wurden für das Erntejahr 2006 an 4 Standorten wiederholt. Eine Vielzahl AFLP- und SSR-Marker zeigte einen Zusammenhang mit dem Phänotyp der Hybriden. Für den Proteingehalt und Braunrost konnte jeweils ein Marker gefunden werden, der bereits im Versuchsjahr 2005 eine Beziehung zu dem agronomischen Merkmal zeigte.

Des Weiteren wurden Primer für Kandidatengene der Stärkebiosynthese aus verwandten Arten entwickelt. Ausgesucht wurden Gene, die für Enzyme des Stärkemetabolismus (GBSS (granule bound starch synthase), sbe (starch branching enzyme) bzw. AGPase (ADP-glucose pyrophosphorylase)) kodieren. Mit 24 Primerpaaren wurden alle Saat- und Polleneltern untersucht. Die gefundenen Polymorphismen erwiesen sich als unzureichend für die Verwendung innerhalb einer Assoziationsstudie. Wahrscheinlich

befinden sich die amplifizierten Genabschnitte in Regionen, die essentiell an der Stärkebiosynthese beteiligt sind.

Summary

The aim of this work was get more information how to breed rye for bio ethanol production. The first step was to evaluate the genetic variation of traits like yield, starch yield and starch content, protein content and pentosan content. A collection of 102 different rye genotypes, containing rye lines and varieties, was investigated. This rye collection was the basis for the development of a calibration curve for the near-infrared spectroscopy to measure starch and protein content.

Different sets of rye inbred lines of the two rye breeding companies KWS Lochow GmbH (32 pollen and 4 seed parents) and HYBRO GmbH & Co. KG (23 seed and 6 pollen parents) were screened for DNA polymorphisms with AFLP (amplified fragment length polymorphism) and microsatellite markers. These inbred lines were the parents in factorial crossing schemes for the production of hybrids in the harvest year 2005. The sets of the two rye breeders were separately handled. Traits of interest to be used in association studies were evaluated from the resulting hybrid combinations. The trials were conducted at 6 (KWS Lochow) and 5 (HYBRO) sites in Germany and Poland. The mean starch content was 65.6 % and 61.6 % for the hybrids of KWS Lochow and HYBRO, respectively. Associated markers could be found for starch content and other agronomical traits.

The field trails of the HYBRO were repeated at 4 locations in the harvest year 2006. A lot of associated AFLP and SSR markers could be found. Two different markers were associated with protein content and brown roset in both years.

To get genetic information about the starch metabolism in rye, primers were developed from sequence areas where candidate genes from related species code for enzymes of the starch metabolism (for example ADP-glucose pyrophosphorylase, granule bound starch synthase, starch branching enzyme). Twenty four primer pairs were tested on all rye inbred lines of both breeders, but did not show enough polymorphisms. A reason may be that the candidate genes are always necessary for starch biosynthesis, so that no variation could be expected.

6 Literaturverzeichnis

Abel, S., 2006: Resynthetisierter Raps als Modell zur Untersuchung der fixierten Heterosis bei allopolyploiden Pflanzen. Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen.

AOAC, 1990: Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 15th Edition. Arlington, Virginia, USA.

Aufhammer, W., H. J. Pieper, H. Stützel, und V. Schäfer, 1993: Eignung von Korngut verschiedener Getreidearten zur Bioethanolproduktion in Abhängigkeit von der Sorte und den Aufwuchsbedingungen. Die Bodenkultur 44, 183-194.

Aufhammer, W., H. J. Pieper, V. Kässer, V. Schäffer, T. Senn, und E. Kübler, 1996: Zur Eignung des Kornguts unterschiedlich stickstoffgedüngter Getreidebestände als Rohstoff für die Bioethanolproduktion. J. Agron. Crop Sci. 177, 185-196.

Aufhammer, W., 1998: Getreide- und andere Körnerfruchtarten. Bedeutung, Nutzung und Anbau. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

Aufhammer, W., 2003: Rohstoff Getreide. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

Bao, J. S., H. Corke, and M. Sun, 2002: Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physiochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetic 105, 898-905.

Barth, S., A. K. Busimi, H. F. Utz, and A. E. Melchinger, 2003: Heterosis for biomass yield and related traits in five hybrids of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Heredity 91, 36-42.

Baumgartner, D., S. Gabioud, F. Gasser, und E. Höhn, 2007: Zerstörungsfreie Messung innerer Qualitätsmerkmale beim Apfel. Schweiz. Z. Obst-Weinbau 12, 10-13.

Becker, H. C., 1993: Pflanzenzüchtung. UTB-Verlag, Stuttgart.

Bednarek, P. T., P. Masojć, R. Lewandowska, and B. Myśków, 2003: Saturating rye genetic map with amplified fragment length polymorphism (AFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of Applied Genetics* 44, 21-33.

Bernhardt, D., 2006: Ökobilanz von Bioethanol.

<http://www.germanwatch.org/handel/eth06.pdf> 16.10.2007

Bickel-Sandkötter, S., 2001: Nutzpflanzen und ihre Inhaltsstoffe. Quelle & Meyer Verlag GmbH & Co., Wiebelsheim.

Bolibok, H., M. Rakoczy-Trojanowska, A. Hromada-Judycka, and R. Pietrzykowski, 2005: Efficiency of different PCR-based marker systems in assessing genetic diversity among winter rye (*Secale cereale* L.) inbred lines. *Euphytica* 146, 109-116.

Bolibok, H., A. Gruszczynska, A. Hromada-Judycka, and M. Rakoczy-Trojanowska, 2007: The identification of QTLs associated with the in vitro response of rye (*Secale cereale* L.). *Cellular & Molecular Biology Letters* 12, 523-535.

Boritzki, M., 2001: Einsatz molekularer Marker für die genetische Differenzierung und Identifikation von Sorten und Akzessionen der Kirschen (*Prunus* ssp.). Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.

Börner, A., V. Korzun, A. V. Voylokov, and W. E. Weber, 1999: Detection of quantitative trait loci on chromosome 5R of rye (*Secale cereale* L.). *Theoretical and Applied Genetic* 98, 1087-1090.

Börner, A., V. Korzun, A. V. Voylokov, A. J. Worland, and W. E. Weber, 2000: Genetic mapping of quantitative trait loci in rye (*Secale cereale* L.). *Euphytica* 116, 203-209.

Boros, D., R. R. Marquardt, B. A. Slominski, and W. Guenter, 1993: Extract viscosity as an indirect assay for water-soluble pentosan content in rye. *Cereal Chemistry* 70, 575-580.

Böse, L., 2007: Empfehlungen zum Anbau von Getreide zur Bioethanolerzeugung.
http://lsa-st23.sachsen-anhalt.de/lfg/infothek/dokumente/bbg_getr_bioethanol.pdf
28.10.2007

Brouwer, W., 1972: Handbuch des speziellen Pflanzenbaues - Band 1. Paul Parey Verlag, Berlin.

Bundessortenamt, 2008: Beschreibende Sortenliste 2008. Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen (großkörnig), Hackfrüchte (außer Kartoffeln). Deutscher Landwirtschaftsverlag GmbH, Hannover.

Charcosset, A., and L. Essioux, 1994: The effect of population structure on the relationship between heterosis and heterozygosity at marker loci. *Theoretical and Applied Genetic* 89, 336-343.

Chen, G., J. Chong, S. Prashar, and J. D. Procunier, 2007: Discovery and genotyping of high-throughput SNP markers for crown rust resistance gene Pc94 in cultivated oat. *Plant Breeding* 126, 379-384.

Comadran, J., J. R. Russell, F. A. van Eeuwijk, S. Ceccarelli, S. Grando, M. Baum, A. M. Stanca, N. Pecchioni, A. M. Mastrangelo, T. Akar, A. Al-Yassin, A. Benbelkacem, W. Choumane, H. Ouabbou, R. Dahan, J. Bort, J.-L. Araus, A. Pswarayi, I. Romagosa, C. A. Hackett, and W. T. B. Thomas, 2008: Mapping adaptation of barley to droughted environments. *Euphytica* 161, 35-45.

Delcour, J. A., S. Vanhamel, and C. De Geest, 1989: Physico-chemical and functional properties of rye nonstarch polysaccharides. I. Colorimetric analysis of pentosans and their relative monosaccharide compositions in fractionated (milled) rye products. *Cereal Chemistry* 66, 107-111.

Devos, K. M., M. D. Atkinson, C. N. Chinoy, H. A. Francis, R. L. Harcourt, R. M. D. Koebner, C. J. Liu, P. Masojic, D. X. Xie, and M. D. Gale, 1993: Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theoretical and Applied Genetic* 85, 673-680.

Devos, K. M., and M. D. Gale, 2000: Genome Relationships: The Grass Model in Current Research. *The Plant Cell* 12, 637-646.

Diepenbrock, W., F. Ellmer, und J. Léon, 2005: Ackerbau, Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

Diers, B. W., P. B. E. McVetty, and T. C. Osborn, 1996: Relationship between Heterosis and Genetic Distance Based on Restriction Fragment Length Polymorphism Markers in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Crop Science* 36, 79-83.

Dieterle, P., F.-P. Engling, H. Horst, C. Paul, K.-D. Robowsky, und P. Tillmann, 2003: Die Anwendung der Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) bei der Untersuchung von Futtermitteln und pflanzlichen Produkten.

<http://www.vdlufa.de/joomla/Dokumente/Standpunkte/07-nirs.pdf> 11.01.2008

Dill, P., 1983: Zur züchterischen Verbesserung der Kornmasse bei Winterroggen (*Secale cereale* L.). *Arch. Züchtungsforsch.* 13, 157-168.

Domon, E., A. Saito, and K. Takeda, 2002: Comparison of the waxy locus sequence from a non-waxy strain and two waxy mutants of spontaneous and artificial origins in barley. *Genes Genet. Syst.* 77, 351-359.

Dreisigacker, S., P. Zhang, M. L. Warburton, M. Van Ginkel, D. Hoisington, M. Bohn, and A. E. Melchinger, 2004: SSR and Pedigree Analyses of Genetic Diversity among CIMMYT Wheat Lines Targeted to Different Megaenvironments. *Crop Science* 44, 381-388.

Festel, G., 2007: Biokraftstoffe in Deutschland – Produktionskosten und Marktchancen. *Chemie Ingenieur Technik* 79, 605-612.

Fischbeck, G., W. Plarre, und W. Schuster, 1985: Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Zweite, neubearbeitete Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin.

Franke, W., 1997: Nutzpflanzenkunde. Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. 6., neubearbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

fuel 21 GmbH & Co. KG, 2008: Bioethanol – Energie der Zukunft. http://www.nordzucker.de/fileadmin/NordzuckerCorp/download_pdf/Broschueren/NZ-fuel21_flyer-Ans.pdf?PHPSESSID=efd98dbf7eefdc4a363fc073549cfc56 05.01.2008

Gambaro, G., F. Anglani, and A. D'Angelo, 2000: Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet* 355, 308 -11.

Geiger, H. H., 2007: Strategies of Hybrid Rye Breeding. *Vorträge für Pflanzenzüchtung* 71, 1-5.

Gimenes, M. A., C. R. Lopes and J. F. M. Valls, 2002: Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. *Genetics and Molecular Biology* 25, 349-353.

Girhammar, U., and B. M. Nair, 1992: Isolation, separation and characterization of water soluble non-starch polysaccharides from wheat and rye. *Food Hydrocolloids* 6, 285-299.

Grosjean, F., P. Maupetit, and M. F. Beaux, 1999: Variability of wheat and other cereal water extract viscosity. 2 – Range and causes of variation. *J Sci Food Agric* 79, 123-130.

Hackauf, B., and P. Wehling, 2002a: Identification of Microsatellite Polymorphisms in an Expressed Portion of the Rye Genome. *Plant Breeding* 121, 17-25.

Hackauf, B., and P. Wehling, 2002b: Development of microsatellite markers in rye: map construction. *Proceedings of the EUCARPIA Rye Meeting, July 4-7 (2001)*, 333-340.

Hall, T. A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.

Hansen, A., 2004: Bioinformatik-Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler. Birkhäuser Verlag, Basel - Boston - Berlin.

Hashimoto, S., M. D. Shogren, and Y. Pomeranz, 1987: Cereal pentosans: Their estimation and significance. I. Pentosans in wheat and milled wheat products. *Cereal Chemistry* 64, 30-34.

Hawthorne, D. J., 2001: AFLP-Based Genetic Linkage Map of the Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata*: Sex Chromosomes and a Pyrethroid-Resistance Candidate Gene. *Genetics* 158, 695-700.

Huth, W., 2002: Die bodenbürtigen Viren von Weizen und Roggen in Europa – ein zunehmendes aber durch ackerbauliche Maßnahmen und Anbau resistenter Sorten lösbares Problem. *Gesunde Pflanzen* 2, 51-57.

Jain, A., S. Bhatia, S. S. Banga, S. Prakash, and M. Lakshmikumaran, 1994: Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relation to heterosis. *Theoretical and Applied Genetics* 88, 116-122.

Jung C., V. Lein, G. Stiewe, P. Wilde, and R. Schachschneider. Getreidezüchtung. In: *Handbuch des Pflanzenbaues*, edited by H. Hanus, in Druck.

Kaltschmitt, M., und H. Hartmann, 2001: Energie aus Biomasse. Grundlage, Techniken und Verfahren. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.

Khlestkina, E. K., M. H. M. Than, E. G. Pestsova, M. S. Röder, S. V. Malyshev, V. Korzun, and A. Börner, 2004: Mapping of 99 new microsatellite-derived loci in rye (*Secale cereale* L.) including 39 expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 725-732.

Kimura, M., 1956: A model of a genetic system which leads to closer linkage by natural selection. *Evolution* 10, 278-287.

Knaak, C., 1996: Schätzung genetischer Distanzen mittels RFLP zur Identifikation von Genpools für die Hybridzüchtung bei Winterraps. Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen.

Konieczny, A., and F. M. Ausubel, 1993: A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal* 4, 403-410.

Koop, S., 2007: Perspektiven für den Roggenanbau 2007. <http://www.saatenunion.de/index.cfm/nav/153/article/2991.html> 13.10.2007

Körber-Grohne, U., 1995: Nutzpflanzen in Deutschland von der Vorgeschichte bis heute - Das kompetente Nachschlagewerk. Lizenzausgabe für Nikol Verlagsgesellschaft GmbH & Co. KG, Hamburg.

Korzun, V., S. Malyshev, A. V. Voylokov, and A. Börner, 2001: A genetic map of rye (*Secale cereale* L.) combining RFLP, isozyme, protein, microsatellite and gene loci. *Theoretical and Applied Genetic* 102, 709-717.

Lander, E. S., and D. Botstein, 1989: Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185-199.

Laube, W., und F. Quadt, 1959: Roggen (*Secale cereale* L.). In: *Handbuch der Pflanzenzüchtung*. 2. Auflage, Band 2, Paul Parey Verlag, Berlin.

Lu, J., M. R. Knox, M. J. Ambrose, J. K. M. Brown, and T. H. N. Ellis, 1996: Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR-based methods. *Theoretical and Applied Genetic* 93, 1103-1111.

Lütke Entrup, N., und J. Oehmichen, 2000: *Lehrbuch des Pflanzenbaues*. Band 2: Kulturpflanzen, Thomas Mann Verlag, Gelsenkirchen.

Mantel, N. A., 1967: The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27, 209-220.

- Masojc, P., A. Banek-Tabor, and M. Twardowska, 2007: QTLs for resistance to preharvest sprouting in rye (*Secale cereale* L.). *Journal of Applied Genetics* 48, 211-217.
- Meksem, K., E. Ruben, D. Hyten, K. Triwitayakorn, and D. A. Lightfoot, 2001: Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA markers. *Mol Genet Genomics* 265, 207-214.
- Meyer, R. C., O. Törjék, M. Becher, and T. Altmann, 2004: Heterosis of Biomass Production in *Arabidopsis*. Establishment during Early Development. *Plant Physiology* 134, 1813-1823.
- Miedaner, T., 2007: Roggenzüchtung. In: Roggen-Getreide mit Zukunft! DLG-Verlag, Frankfurt am Main.
- Milczarski, P., and P. Masojć, 2007: Mapping of QTLs for agronomic traits in rye. *Vorträge für Pflanzenzüchtung* 71, 263-265.
- Mohammadi, R., E. Farshadfar, M. Aghaee-Sarbarzeh, and J. Sutka, 2003: Locating QTLs controlling drought tolerance criteria in rye using disomic addition lines. *Cer Res Comm* 31, 257-262.
- Moschner, C. R., 2003: Abschätzung des Gehaltes wertgebender Inhaltsstoffe von Sonnenblumensaat mittels Nahinfrarotspektroskopie (NIR). Diplomarbeit, Fachhochschule Hannover.
- Mutisya, J., P. Sathish, C. Sun, L. Andersson, S. Ahlandsberg, Y. Baguma, S. Palmqvist, B. Odhiambo, P. Aman, and C. Jansson, 2003: Starch branching enzymes in sorghum (*Sorghum bicolor*) and barley (*Hordeum vulgare*): comparative analyses of enzyme structure and gene expression. *J. Plant Physiol.* 160, 921-930.
- Nakamura, T., M. Yamamori, H. Hirano, S. Hidaka, and T. Nagamine, 2005: Production of waxy (amylose-free) wheats. *Mol Gen Genet* 248, 253-259.

- Nei, M., 1972: Genetic distance between populations. *Amer. Naturalist*, 106, 283-292.
- Obst, A., und K. Gehring, 2002: Getreide. Krankheiten - Schädlinge - Unkräuter. Thomas Mann Verlag, Gelsenkirchen.
- Oest, W., 2000: Kraftstofferzeugung aus Biomasse.
http://www.mu1.niedersachsen.de/functions/downloadObject/0,,c1181526_s20,00.PDF
14.10.2004
- Patron, N. J., A. M. Smith, B. F. Fahy, C. M. Hylton, M. J. Naldrett, B. G. Rossnagel, and K. Denyer, 2002: The Altered Pattern of Amylose Accumulation in the Endosperm of Low-Amylose Barley Cultivars Is Attributable to a Single Mutant Allele of Granule-Bound Starch Synthase I with a Deletion in the 5'-Non-Coding Region. *Plant Physiology* 130, 190-198.
- Philipp, U., P. Wehling, and G. Wricke, 1994: A linkage map of rye. *Theoretical and Applied Genetic* 88, 243-248.
- Picard, K., 2006: Biokraftstoffe aus Sicht der Mineralölindustrie. *Technikfolgenabschätzung – Theorie und Praxis* 1, 34-41.
<http://www.itas.fzk.de/tatup/061/pica06a.pdf> 16.10.2007
- Powell, W., G. C. Machray and J. Provan, 1996a: Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1, 215-222.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski, 1996b: The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2, 225-238.
- Rademacher, J., 2002: Messung des Proteingehaltes während des Mähdrusches. *Landtechnik* 57, 354-355.

Ravel, C., S. Praud, A. Canaguier, P. Dufour, S. Giancola, F. Balfourier, B. Chalhoub, D. Brunel, L. Linossier, M. Dardevet, M. Beckert, M. Rousset, A. Murigneux, and G. Charmet, 2007: DNA sequence polymorphisms and their application to bread wheat quality. *Euphytica* 158, 331-336.

Rodemann, B., 2007: Vortrag zum Europäischen Roggenkongress 2007. Kurzfassung in: Roggen-Getreide mit Zukunft! DLG-Verlag, Frankfurt am Main.

Roggenforum, 2006: Roggen. Anbau und Vermarktung.

http://www.roggenforum.de/images/downloads/Download%203/GGTSPU-styx2.bba.de-3806-8890010-DAT/RF_Broschuere_2006.pdf?startcat=1&lang=de
02.11.2008

Roggenforum, 2007: Roggen europaweit gefragt.

<http://www.roggenforum.de/content/content2.php?CatID=10&NewsID=434&startcat=1&lang=de> 12.08.2007

Rohlf, F. J., 1998: NTSYSpc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.11S. Applied Biosystems Inc., Setauket, NY.

Rosenberger, A., H.-P. Kaul, T. Senn, und W. Aufhammer, 2000: Optimierung der Produktion von Wintergetreide zur Bioethanolherstellung durch unterschiedlich intensive Anbauverfahren. *J. Agronomy & Crop Science* 185, 55-65.

Rozen, S., and H. J. Skaletsky, 2000: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: S. Krawetz, S. Misener (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.

Russell J. R., J. D. Fuller, M. Macaulay, B. G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell, R. Waugh, 1997: Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetic* 95, 714-722.

Saal, B., P. Senft, und G. Wricke, 1997: Erstellung einer dicht besetzten Kopplungskarte mit Hilfe molekularer Marker beim Roggen (*Secale cereale* L.). Vorträge für Pflanzenzüchtung 38, 267-285.

Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft, 2006: Kraftstoff Bioethanol. http://www.smul.sachsen.de/lfl/publikationen/download/1997_1.pdf 12.08.2007

Saghai-Marooif, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, and R. W. Allard, 1984: Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 8014-8018.

SAS Institute Inc., 2002-2003: Cary, NC27513, USA.

Sauter, C., 2005: Unbestellte Äcker sind bei teurem Rohöl ein Anachronismus. VDI Nachrichten, 11. November 2005.

http://www.esyoil.com/s11_Unbestellte_Aecker_sind_bei_teurem_Rohoel_ein_Anachronismus.php 05.01.2008

Schlegel, R., und V. Korzun, 2007: Genes, marker and linkage data of rye (*Secale cereale* L.) 6th updated inventory. Vorträge für Pflanzenzüchtung 71, 225-245.

Schmalz, H., 1980: Pflanzenzüchtung. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin.

Schmitz, N., 2003: Bioethanol in Deutschland. Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“ Band 21, BMVEL, Landwirtschaftsverlag, Münster.

Schraa, M., 2007: Roggenanbau wieder attraktiver.

<http://www.zmp.de/presse/agrarwoche/marktanalysen/ma04.pdf> 10.10.2007

Seibel, W., und W. Steller, 1988: Roggen: Anbau, Verarbeitung, Markt. Behr's Verlag, Hamburg.

Senft, P., und G. Wricke, 1996: An extended genetic map of rye (*Secale cereale* L.). Plant Breeding 115, 508-510.

Seyfried, F., 2006: Biokraftstoffe aus Sicht der Automobilindustrie.

Technikfolgenabschätzung – Theorie und Praxis 1, 42-50.

<http://www.itas.fzk.de/tatup/061/seyf06a.pdf> 16.10.2007

Shan, X., T. K. Blake, and L. B. Talbert, 1999: Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. Theoretical and Applied Genetic 98, 1072-1078.

Shang, H.-Y., Y.-M. Wie, X.-R. Wang, and Y.-L. Zheng, 2006: Genetic diversity and phylogenetic relationships in the rye genus *Secale* L. (rye) based on *Secale cereale* microsatellite markers. Genetics and Molecular Biology 29, 685-691.

Shimada, H., Y. Tada, T. Kawasaki, and T. Fujimura, 1993: Antisense regulation of the rice *waxy* gene expression using a PCR-amplified fragment of the rice genome reduces the amylose content in grain starch. Theoretical and Applied Genetic 86, 665-672.

Sidio, L., 2002: Biomasse als Energieträger in unterschiedlichen Wandlungssystemen. Stoffliche Anforderungen an den Energieträger für und Möglichkeiten der Anpassung an mikrobielle – enzymatische Wandlungssysteme. Diplomarbeit, Universität Kassel.

Skot, L., N. R. Sackville Hamilton, S. Mizen, K. H. Chorlton, and I. D. Thomas, 2002: Molecular genecology of temperature response in *Lolium perenne*: 2. association of AFLP markers with ecogeography. Mol Ecol 11, 1865-1876.

Smith, O. S., J. S. C. Smith, S. L. Bowen, R. A. Tenborg, and S. J. Wall, 1990: Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F1 grain yield, grain yield, heterosis, and RFLPs. Theoretical and Applied Genetics 80, 833-840.

Song, C., and R. Otto, 1995: Schnellbestimmung von wertbestimmenden Komponenten in Wurstwaren mittels Nahe-Infrarot-Transmissionsspektroskopie. Z Lebensm Unters Forsch 201, 226-229.

Statistisches Bundesamt, 2005: Es wächst weniger Getreide, aber Winterraps legt zu. Pressemitteilung Nr. 023 vom 17.01.2005.

http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2005/01/PD05_023_412,templateId=renderPrint.psml 28.10.2007

Statistisches Bundesamt, 2007: Herbstsaaten zur Ernte 2007: Mehr Winterroggen angebaut. Pressemitteilung vom 17. Januar 2007.

<http://www.destatis.de/presse/deutsch/pm2007/p0270141.htm> 29.03.2007 28.10.2007

Statistisches Bundesamt, 2008: Mehr Getreide, weniger Raps. Pressemitteilung Nr. 192 vom 27.05.2008.

http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2008/05/PD08_192_412,templateId=renderPrint.psml 18.10.2008

Sun, C., P. Sathish, S. Ahlandsberg, and C. Jansson, 1998: The Two Genes Encoding Starch-Branching Enzymes IIa and IIb Are Differentially Expressed in Barley. *Plant Physiology* 118, 37-49.

Tautz, D., 1989: Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.* 17, 6463-6471.

Thiemt, E. M., T. Senn, und G. Oettler, 2004: Triticale als nachwachsender Rohstoff für die Ethanolproduktion. *Vorträge für Pflanzenzüchtung* 64, 160-162.

Thorbjørnsen, T., P. Villand, L. A. Kleczkowski, and O.-A. Olsen, 1996: A single gene encodes two different transcripts for the ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit from barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem. J.* 313, 149-154.

Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, 2006: Bioethanol als Kraftstoff. <http://www.tll.de/ainfo/pdf/etha0606.pdf> 12.08.2007

Tillmann, P., 2001: Qualitätssicherung für die NIRS-Analytik – Die Netzwerke des VDLUFA für die Untersuchung von Silomais und Silagen. ALVA-Jahrestagung, Wolfpassing.

<http://www.gumpenstein.at/publikationen/alva2001/pdf/tillmann.pdf> 13.01.2008

Visser R. G. F., I. Somhort, G. J. Kuipers, N. J. Ruys, W. J. Feenstra, and E. Jacobsen, 1991: Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Mol Gel Genet* 225, 298-296.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. v. d. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau, 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23, 4407-4414.

Vuylsteke, M., R. Mank, R. Antonise, E. Bastiaans, M. L. Senior, C. W. Stuber, A. E. Melchinger, T. Lübberstedt, X. C. Xia, P. Stam, M. Zabeau and M. Kuiper, 1999: Two high-density AFLP® linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetic* 99, 921-935.

Vuylsteke, M., M. Kuiper, and P. Stam, 2000: Chromosomal regions involved in hybrid performance and heterosis: their AFLP-based identification and practical use in prediction models. *Heredity* 85, 208-218.

Weber, W. E., E. Schumann, M. Lausch, P. Wilde, und W. Flamme, 2004: Züchtung von Roggen auf Stärkegehalt und andere Rohstoffparameter. Proc. 10. Internationaler Kongress für nachwachsende Rohstoffe und Pflanzenbiotechnologie, 07.-08.06.2004, Magdeburg, 12 S.

Wehling, P., 2006: Züchtungsforschung zu Qualitätseigenschaften bei Getreide. http://www.bcv.org/projects/ifbp/GGTSPU-styx2.bba.de-3806-3788777-DAT/Prof_Wehling.pdf 18.10.2008

Wetzel, D. L., 1983: Near-infrared reflectance analysis. Sleeper among spectroscopic techniques. *Anal. Chem.* 55, 1165-1176.

Witsenboer, H., R. W. Michelmore, and J. Vogel, 1997: Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.). *Genome* 40, 923-936.

Wricke, G., and P. Wehling, 1985: Linkage between an incompatibility locus and a peroxidase isozyme locus (Prx7) in rye. *Theoretical and Applied Genetic* 71, 289-291.

Wricke, G., and W. E. Weber, 1986: *Quantitative Genetics and Selection in Plant Breeding*. W. de Gruyter, Berlin.

Wricke, G., P. Wilde, P. Wehling, and C. Gieselmann, 1993: An isozyme marker for pollen fertility restoration in the Pampa cms system of rye (*Secale cereale* L.). *Plant Breeding* 111, 290-294.

Wu, X., R. Zhao, D. Wang, S. R. Bean, P. A. Seib, M. R. Tuinstra, M. Campbell, and A. O'Brien, 2006: Effects of amylose, corn protein, and corn fiber contents on production of ethanol from starch-rich media. *Cereal Chemistry* 83, 569-575.

Yamamori, M., and N. T. Quynh, 2000: Differential effects of Wx-A1, -B1 and -D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theoretical and Applied Genetic* 100, 32-38.

Zanella A., O. Rossi, M. Cecchinell, A. Panarese, M. Coser, and P. Cazzanelli, 2005: Non-Destructive NIRS-Assessment of Apple Quality Parameters, Compared to Conventional Analysis by an Appropriate Statistical Procedure. *Acta Hort.* 682, 1505-1512.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda, 1994: Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176-183.

7 Anhang

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

	Seite
Abbildung 1: Schema zur Entwicklung von Roggenhybriden	3
Abbildung 2: Aufbau der Feldversuche von KWS Lochow und HYBRO	11
Abbildung 3: Dendrogram der 36 Roggeninzuchtlinien der KWS Lochow basierend auf 411 polymorphen SSR-Fragmenten	72
Abbildung 4: Dendrogram der 29 Roggeninzuchtlinien der HYBRO basierend auf 524 polymorphen SSR-Fragmenten	73
Abbildung 5: Dendrogram der 36 Inzuchtlinien der KWS Lochow basierend auf 1646 polymorphen AFLP-Fragmenten	74
Abbildung 6: Dendrogram der 29 Roggeninzuchtlinien der HYBRO basierend auf 1780 polymorphen AFLP-Fragmenten	75
Abbildung 7: Vergleich von zwei Distanzmatrizen basierend auf den SSR- und AFLP-Daten aus den KWS Lochow-Versuchen	76
Abbildung 8: Vergleich von zwei Distanzmatrizen basierend auf den SSR- und AFLP-Daten aus den HYBRO-Versuchen	76
Abbildung 9: Dendrogram der 36 Inzuchtlinien der KWS Lochow basierend auf 2122 polymorphen SSR- und AFLP-Fragmenten	77
Abbildung 10: Dendrogram der 29 Roggeninzuchtlinien der HYBRO basierend auf 2416 polymorphen SSR- und AFLP-Fragmenten	78
Abbildung 11: Vereinfachtes Schema der Stärkebiosynthese	102

Tabellen

	Seite
Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten AFLP-Primerkombinationen	20
Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten AFLP-Adapter	22
Tabelle 3: Verwendete Restriktionsenzyme, ihre Erkennungssequenzen und Schnittstellen	26
Tabelle 4: Mittel-, Minimum- und Maximumwerte ausgewählter Merkmale für die Roggenkollektion	30
Tabelle 5: Korrelationskoeffizienten zwischen den untersuchten Merkmalen der Roggenkollektion	31
Tabelle 6: Mittel-, Minimum- und Maximumwerte der nasschemischen Analyse für ausgewählte Merkmale der Roggenkollektion	32
Tabelle 7: Korrelationskoeffizienten zwischen Merkmalen, die mit beiden Methoden (NIT und nasschemisch (NCA)) analysiert wurden	33
Tabelle 8: Ergebnisse der Validierung für das Infratec-Gerät	34
Tabelle 9: Ergebnisse der Validierung für das NIRSystems-Gerät	35
Tabelle 10: Mittelwert, Minimum und Maximum für die wichtigsten Merkmale der KWS Lochow-Hybriden im Erntejahr 2005	36
Tabelle 11: Varianztabelle und Heritabilitäten (h^2) für die Merkmale der Hybriden der KWS Lochow im Erntejahr 2005	37
Tabelle 12: Korrelationskoeffizienten zwischen den untersuchten Merkmalen der Hybriden der KWS Lochow	38
Tabelle 13: Mittelwert, Minimum und Maximum für die wichtigsten Merkmale der Hybridkombinationen im Erntejahr 2005 an 6 Standorten der KWS Lochow	39
Tabelle 14: Mittelwerte der untersuchten Merkmale der KWS Lochow-Hybriden im Erntejahr 2005 getrennt für die 4 Saateltern	40
Tabelle 15: Mittelwert, Minimum und Maximum für die wichtigsten Merkmale der HYBRO-Hybriden im Erntejahr 2005	41
Tabelle 16: Varianztabelle und Heritabilität (h^2) für die Merkmale der Hybriden der HYBRO im Erntejahr 2005	42
Tabelle 17: Korrelationskoeffizienten zwischen den untersuchten Merkmalen der Hybriden der HYBRO im Erntejahr 2005	43

	Seite
Tabelle 18: Mittelwert, Minimum und Maximum für die wichtigsten Merkmale der Hybridkombinationen im Erntejahr 2005 an 5 Standorten der HYBRO	44
Tabelle 19: Mittelwerte der untersuchten Merkmale der HYBRO-Hybriden im Erntejahr 2005 getrennt für die 6 Polleneltern	45
Tabelle 20: Mittelwert, Minimum und Maximum für die wichtigsten Merkmale der HYBRO-Hybriden im Erntejahr 2006	46
Tabelle 21: Varianztabelle und Heritabilität (h^2) für die Merkmale der Hybriden der HYBRO des Erntejahres 2006	47
Tabelle 22: Korrelationskoeffizienten zwischen den untersuchten Merkmalen der Hybriden der HYBRO im Erntejahr 2006	48
Tabelle 23: Mittelwert, Minimum und Maximum für die wichtigsten Merkmale der Hybridkombinationen im Erntejahr 2006 an 4 Standorten der HYBRO	49
Tabelle 24: Mittelwerte der untersuchten Merkmale der HYBRO-Hybriden im Erntejahr 2006 getrennt für die 6 Polleneltern	50
Tabelle 25: Varianztabelle für die Merkmale der Hybriden der HYBRO in den Erntejahren 2005 und 2006	51
Tabelle 26: Korrelationskoeffizienten zwischen den untersuchten Merkmalen der Hybriden der HYBRO in den beiden Erntejahren 2005 und 2006	52
Tabelle 27: Ergebnisse der Bioethanolausbeute- und Stärkegehaltsbestimmung ermittelt an 15 Hybriden der KWS Lochow	53
Tabelle 28: Ergebnisse der Bioethanolausbeute- und Stärkegehaltsbestimmung ermittelt an 12 Hybriden der HYBRO	54
Tabelle 29: Korrelationskoeffizienten zwischen der Alkoholausbeute und weiteren Merkmalen der untersuchten Hybriden von KWS Lochow und HYBRO	55
Tabelle 30: Ergebnisse der SSR-Analyse; ermittelt mit 133 Markern in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der KWS Lochow	55
Tabelle 31: Ergebnisse der SSR-Analyse; ermittelt mit 252 Markern in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der HYBRO	56

	Seite
Tabelle 32: Ergebnisse der SSR-Analyse; ermittelt mit 22 genomischen SSR-Markern in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der KWS Lochow	56
Tabelle 33: Ergebnisse der SSR-Analyse; ermittelt mit 111 EST-SSR-Markern in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der KWS Lochow	57
Tabelle 34: Ergebnisse der SSR-Analyse; ermittelt mit 9 genomischen SSR-Markern in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der HYBRO	57
Tabelle 35: Ergebnisse der SSR-Analyse; ermittelt mit 243 EST-SSR-Markern in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der HYBRO	57
Tabelle 36: Ergebnisse der AFLP-Analyse mit 16 <i>PstI-MseI</i> und 40 <i>EcoRI-MseI</i> Primerkombinationen in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der KWS Lochow	59
Tabelle 37: Ergebnisse der AFLP-Analyse mit 16 <i>PstI-MseI</i> und 40 <i>EcoRI-MseI</i> Primerkombinationen in den elterlichen Roggeninzuchtlinien der HYBRO	61
Tabelle 38: Primerpaare, deren Sequenzen, die Genbankherkunft der zur Entwicklung verwendeten Sequenzabschnitte und die erforderlichen PCR-Bedingungen	64
Tabelle 39: Übersicht zu den mit den entwickelten Primern amplifizierten Fragmentgrößen (bp) im Roggenmaterial der KWS Lochow und HYBRO sowie in Gerste, Weizen und Reis	66
Tabelle 40: Zusammenfassung des Alignments der Sequenzen mit bekannten Nukleotidsequenzen in der NCBI-Datenbank	68
Tabelle 41: Ergebnisse der Überprüfung der Kandidatengenprimer in den 32 Pollenelterlinien der KWS Lochow und den 23 Saateltern der Hybro	70
Tabelle 42: Übersicht zu den Ergebnissen des Restriktionsverdaus der PCR-Produkte der Primerpaare GBSSII4 und GBSSII5	71
Tabelle 43: Mittelwert, Minimum und Maximum für die genetischen Distanzwerte der Polleneltern mit den verschiedenen Saateltern im Versuch der KWS Lochow	79

	Seite
Tabelle 44: Mittelwert, Minimum und Maximum für die genetischen Distanzwerte der Saateltern mit den verschiedenen Polleneltern im Versuch der HYBRO	79
Tabelle 45: Korrelationskoeffizienten zwischen den Ergebnissen der Diversitätsanalyse für die einzelnen Saateltern der KWS Lochow und den jeweils ermittelten Merkmalen der Hybriden	80
Tabelle 46: Korrelationskoeffizienten zwischen den Ergebnissen der Diversitätsanalyse für die einzelnen Polleneltern der HYBRO und den jeweils ermittelten Merkmalen der Hybriden für das Erntejahr 2005	80
Tabelle 47: Darstellung der Ergebnisse der Assoziationsstudie für das Material der KWS Lochow	82
Tabelle 48: Darstellung der Ergebnisse der Assoziationsstudie für das Material der HYBRO ermittelt mit den phänotypischen Daten aus dem Erntejahr 2005	84
Tabelle 49: Darstellung der Ergebnisse der Assoziationsstudie für das Material der HYBRO ermittelt mit den phänotypischen Daten aus dem Erntejahr 2006	86

A1 Protokoll zur Bestimmung der Bioethanolausbeute von Getreidekörnern

(PD Dr. Thomas Senn)

Standard-Gärversuch

- Einwaage von 80 g Schrot, vermahlen über 0,5 mm-Sieb Schlagrotor-Mühle in einem Maischbecher
- Zugabe von 300 ml Leitungswasser
- gut vermischen und darauf achten, dass keine Klumpen gebildet werden
- pH-Wert einstellen auf 6,0 – 6,5 mit 1N Natronlauge
- Zugabe des Verflüssigungsenzyms
 - Dosierung (z.B.)
 - Liquozyme: 0,5 ml auf 25 ml auffüllen; davon 0,5 ml pro Ansatz
 - Spirizym BA-T: 0,5 ml auf 25 ml auffüllen; davon 0,435 ml pro Ansatz
- auf 65°C erhitzen und 30 min halten
- danach abkühlen auf 52°C
- pH-Wert einstellen auf 5,0 – 5,2 mit 1N Schwefelsäure
- Verzuckerungsenzyme zugeben; dazu werden verwendet: Fungal- α -Amylase aus *Aspergillus oryzae* + Glucoamylase aus *Aspergillus niger* + Glucoamylase aus *Rhizopus spec.*
 - Dosierung (z. B.) berechnet nach Herstellerangaben für 50 g Stärke im Ansatz; oder als Hohenheimer Vorschlag zum optimalen Stärkeabbau:
 - SAN-Super: 0,5 ml auffüllen auf 25 ml; davon 0,4 ml pro Ansatz
 - + Fungal- α -Amylase (z. B. Fungamyl): 0,5 ml auffüllen auf 25 ml; davon 0,24 ml pro Ansatz
 - + Gammaclast: 0,5 g auffüllen auf 25 ml; davon 1,0 ml pro Ansatz
- 30 min bei 52°C halten
- auf 30°C abkühlen
- 1 g rehydratisierte Hefe (ca. 20-30 min) hinzugeben
- (evtl. 2 ml Kaliumdisulfit-Lösung (4 g/100 ml) zudosieren)
- Maische quantitativ in einen 1l-Erlenmeyerkolben überführen
- mit Leitungswasser auf 500 g auffüllen

- 2 Tropfen Antischaum zugeben
- Gesamtgewicht, Erlenmeyerkolben + Maische bestimmen
- mit Gäraufsatz verschließen
- 3 Tage bei 30°C im Wasserbad vergären

Die Alkoholbestimmung erfolgt mittels Probedestillation und Bestimmung der Dichte im gewonnenen Destillat. Um ausreichende Genauigkeiten zu erzielen, empfiehlt sich ein massenbezogenes Vorgehen bei der Ermittlung des Alkoholgehaltes. D. h. Einwiegen des zu destillierenden Aliquots an vergorener Maische, Aufwiegen des gewonnenen Destillat auf einen genauen Wert, Bestimmung des Alkoholgehalts in %mas aus der Dichte des gewonnenen und aufgewogenen Destillates. Daraus kann dann errechnet werden, wie viele Gramm Alkohol je 100 g Rohstoff gewonnen wurden. Über die Dichte des Ethanols können dann auch die ml Alkohol je 100 g Rohstoff errechnet und auf l Alkohol/100 kg Rohstoff umgerechnet werden.

Insgesamt wurden alle Proben einer Doppelbestimmung unterzogen und der Mittelwert gebildet.

A2 Liste der häufig verwendeten Puffer und Lösungen

AFLP-Filler

30 mg Blue Dextran 2000
5 ml Formamid

10x AFLP Reaktionspuffer

50 mM DTT
500 ng/µl BSA
100 mM Tris-HAc (pH 7,5)
100 mM Magnesiumacetat
500 mM Kaliumacetat

Bind Silane

3 µl Bind Silane
1 ml 99,8 % Ethanol

6x BPB-Ladepuffer

0,25 % Bromphenolblau
40 % Saccharose

CTAB-Extraktionspuffer

100 mM Tris
0,7 M NaCl
10 mM EDTA
H₂O

autoklavieren

auf 120 ml Extraktionspuffer werden 1,2 g CTAB + 1,072 ml β-Mercaptoethanol vor
Verwendung zugegeben

Ethidiumbromid-Färbelösung

0,5 µg/ml Ethidiumbromid
1x TAE

Licor-Ladepuffer

95 ml Formamid
2 ml 0,5 M EDTA
100 mg Fuchsin, basisch
10 mg BPB

50x TAE

2M Tris-Acetat
50 mM EDTA (pH 8,0)

10x TBE

0,89 M Tris
0,89 M Borsäure
20 mM EDTA (pH 8,0)

1x TE

10 mM Tris- HCl (pH 8,0)
0,5 M EDTA (pH 8,0)

10 mg/ml RNAase

RNAase
0,01 M Natriumacetat (pH 5,2)
15 min bei 100°C erhitzen, abkühlen lassen
1/10 1 M Tris (pH 4,0) zugeben

A3 Merkmale der KWS Lochow-Hybriden, die für die Bestimmung der Alkoholausbeute ausgewählt worden

Hybriden	Alkoholausbeute (l/100kg)	Stärkegehalt (%)	Proteingehalt (%)	Korn-ertrag (dt/ha)	Stärke-ertrag (dt/ha)	hl-Gewicht (kg)	TK M (g)	Pflanzenhöhe (cm)	Fallzahl (s)	löslicher Pentosan-gehalt (%)
LP_a	40,0	66,8	9,0	109,8	73,3	76,4	37,5	133,0	225,0	1,1
LP_b	39,3	64,2	10,1	106,1	68,1	77,7	34,5	138,0	256,0	2,1
LP_c	40,2	67,1	8,6	110,7	74,2	76,3	34,2	128,0	236,0	1,1
LP_d	40,0	66,9	9,3	104,4	69,8	77,2	36,3	128,0	273,0	1,3
LP_e	40,1	67,1	9,2	110,9	74,5	76,6	37,8	128,0	258,0	1,1
LP_f	38,6	65,4	10,2	104,1	68,1	75,4	35,4	128,0	240,0	1,3
LP_g	38,6	61,3	11,4	102,4	62,7	78,7	32,7	130,0	276,0	2,0
LP_h	39,3	66,3	10,5	104,5	69,3	76,2	36,3	133,0	247,0	1,1
LP_i	38,8	63,6	10,2	105,5	67,1	76,0	39,3	135,0	270,0	1,7
LP_j	38,6	63,4	11,4	96,2	61,0	75,7	33,9	123,0	288,0	1,9
LP_k	39,3	63,1	11,0	102,1	64,4	76,8	38,4	133,0	254,0	1,8
LP_l	38,6	59,5	12,3	104,5	62,2	76,1	34,8	133,0	226,0	2,4
LP_m	39,5	64,9	9,7	107,8	69,9	77,6	36,9	135,0	220,0	1,6
LP_n	38,7	62,4	10,4	101,5	63,4	75,8	34,8	143,0	184,0	2,4
LP_o	39,3	63,4	10,4	107,6	68,2	75,8	38,4	135,0	287,0	2,0
Mittel	39,3	64,3	10,2	105,2	67,7	76,6	36,1	132,2	249,3	1,7
Min	38,6	59,5	8,6	96,2	61,0	75,4	32,7	123,0	184,0	1,1
Max	40,2	67,1	12,3	110,9	74,5	78,7	39,3	143,0	288,0	2,4

A4 Merkmale der HYBRO-Hybriden, die für die Bestimmung der Alkoholausbeute ausgewählt worden

Hybriden	Alkoholausbeute (l/100kg)	Stärkegehalt (%)	Proteingehalt (%)	Korn-ertrag (dt/ha)	Stärke-ertrag (dt/ha)	hl-Gewicht (kg)	TK M (g)	Pflanzen-höhe (cm)	Fallzahl (s)	löslicher Pentosan-gehalt (%)
HYL01	37,9	60,9	9,7	97,7	59,5	73,3	35,2	144,9	265,0	3,1
HYL04	39,8	63,0	9,2	100,7	63,5	74,7	37,6	155,1	251,7	2,3
HYL05	39,6	62,2	8,9	101,1	62,9	74,9	37,2	150,7	269,8	2,4
HYL06	39,3	62,7	8,8	99,8	62,6	72,7	37,9	153,2	249,9	2,5
HYL07	39,3	61,1	10,3	95,8	58,5	73,7	38,9	149,3	197,0	2,5
HYL09	38,6	60,6	9,9	96,4	58,5	74,1	39,4	151,5	199,2	2,9
HYL10	38,6	61,9	9,3	98,1	60,7	72,3	38,3	159,5	222,0	2,7
HYL12	38,7	60,9	10,1	98,3	59,9	74,7	37,3	148,8	207,5	2,7
HYL13	39,3	61,1	9,7	96,7	59,1	71,8	37,1	140,6	253,3	2,8
HYL15	39,3	62,2	8,9	103,3	64,3	74,7	38,3	155,7	226,6	2,6
HYL16	39,4	61,1	9,8	94,7	57,9	75,1	38,8	157,3	259,3	2,5
HYL17	39,0	61,9	9,3	100,5	62,2	73,8	37,0	152,2	223,5	2,5
Mittel	39,1	61,6	9,5	98,6	60,8	73,8	37,7	151,6	235,4	2,6
Min	37,9	60,6	8,8	94,7	57,9	71,8	35,2	140,6	197,0	2,3
Max	39,8	63,0	10,3	103,3	64,3	75,1	39,4	159,5	269,8	3,1

A5 Sequenzen der mittels Kandidatengenprimer amplifizierten PCR-Produkte

Hw3 721bp

TGATTGAGAAGCACGAGGGAGGCCTTGAAGAGTTCTCTAAAGGTCAGCATTGTTCATGCAT
TCGGAACAATAGTACTCATTTTGTGCCATCCGCAGCACAAAAGGACATAATGTAACCTCTGTG
TTTTAGGCTACTTGAAGTTTGGGATCAACACAGAAAATGATGCAACTGTGTACCGGGAATGG
GCCCTGCAGCAAAGTAAGTTCTAATGTTGTCACACAGCTAATTGCAATGGTCATTGGTTAA
CCTATGCAGTGCTGACGAACTTTCTAAGAGTTAGAGTATTTCCATTTTTGTTTCCAGTGAG
ATCGCTTGTCTTTTCTGATTGTAGCTACTGATATTTCAAGTTTTCACTCATGGCTTGTCTGTG
CTGTTAGGTAAAGCATCACAGGTATATCAGGATGCGCTAGAGCGAAAATATGAAATATGTTT
TCCCTTTTCTAGTTGTTGTCATAGTTGGCTGGTATTCATTTCTTTTATGGCAACATTTACTTCT
CATTAAATTTCAAATAAATAAATTTACTTCTCATTATCTTTAGTGGATTTATAAAATTTACTT
GCAAGTCTTTACTTTATGGGTGTAGGGAAGCACAACTTATTGGTGACTTCAACAACTGGAAT
GGCTCTGGGCACAGGATGACCAAGGATAATTTGGTGTGGTCAATCAGGATTTCCCATGT
CAATGGGAAGCCTGCCATCCCCATAATTCCAA

sbeII 719bp

ATTTACCGTGGAGATGGACTATGGGTTGATCGGGTTCCTGCGTGGATTCTGTTATGCAACTTT
TGATGCCTCTAAATTTGGAGCTCCATATGACGGTGTTCACTGGGATCCACCAACTGGTGAAA
GGTCTACTTTTAGTGGCTTGAGAGCAAGAAATCTAAGTAAAACCCACATAATTAACCTAAAT
TAATGTGGAGACATGATACTTTTATTTCTCGTTTTGTCAGGTATGTGTTAACCATCCCCGGCC
TCGAAAGCCTGACGCTCCACGTATTTACGAGGCTCATGTGGGGATGAGTGGTGAAAAGCCTG
AAGTAAGCACATACAGAGAATTTGCAGACAATGTGTTACCGCGCATAAAGGCAAACAATA
CAACACAGTTCAGCTGATGGCAATCATGGAACATTCATATTATGCTTCTTTTGGGTACCATGT
GACGAATTTCTTCGCAGTTAGCAGCAGATCAGGAACGCCAGAGGACCTCAAATATCTTGTG
ACAAGGCACATAGTTTAGGGCTGCGTGTCTGATGGATATTGTCCATAGCCATGCGAGCAGT
AATATGACAGATGGTCTAAATGGCTATGATGTTGGACAGAACACACAGGAGTCCTATTTCCA
CACAGGAGAAAGGGGCTATCATAAACTGTGGGATAGTCGCTGTTCAACTATGCCAATTGG
GAGGTCTTACGGTTTCTTCTTTCTAATCTGAGATAT

sbe12 780bp

GGATGGACGAATTCATGTTTGATGGCTCCGATTTGACGGGGTAACATCCATGCTATATAAT
CACCATGGTATCAATATGTCATTCGCTGGAAATTACAAGGAATATTTGCGTTTGGATACCGA
TGTGGATGCAGTTGTTTACATGATGCTTGCGAACCATTTAATGCACAACTCTTGCCAGAAG
CAACTGTTGTTGCAGAAGATGTTTCAGGCATGCCAGTGCTTTGTCGGTCAGTTGATGAAGGT
GGAGTAGGGTTTACTATCGCCTGGCTATGGCTATTCCTGATAGATGGATTGACTACTTGAA
GAACAAAGATGACCTTGAATGGTCAATGAGTGGAATAGCACATACTTTGACCAACAGGAGG
TATACGGAAAAGTGCATTGCATATGCTGAGAGCCATGATCAGGTATGTTTTCCCTCCTTTGCC
GGTGTGCGTGAGTATGTGTTCTTTCTTTATGGGGCACTGGTCTAAGAACATACAGTTCAAAG
GTGAAACACTTTCTTTGCCTGGTAGACAAATTTGAGAAATAAACCTCACATGATGACTTTTA
GTTACTTCACGAGTTCCAATCAGATTAGTTATATTCTGATAACTAGTGACAGTACCCACTAAC
CCGCTATTACAAACCATGTAAGAATGTCTGAACATCTGCAGTTATATATCGTCGGCTTTGTGT
TCGTCTATTGAAACAACCTGAGTAGTTAATTTTCATGCAAATTTTCAGTCTATTGTTGGCGACA
AGACTATGGCATTCTCTTGATGGACAAGGAAA

sbe13 817bp

TTGATCGTGGCATTGCACTTCAAAGGTTGATTTGTTTTAAGTATTCCCTGAATTTGATGGTTC
TAGTTCTAGACGAGTATTTAATCTTCGTTGGTTTATTAGAGTTCTGGTTAGCCTTTGAGGA
TAATGTATTCCAGTCCCTTTGGTACATTTGGTTTATTTGTTACAAATATTTTCAGATGATTCA
CTTCATCACCATGGCCCTTGGAGGTGACGGCTACTTGAATTTTATGGGTAATGAGGTAATAT
CTGGTTATCTGTCAAACTTATTTCTGATCAATATGTTTCAAGATTCGTTAAAAATCCTTTGG
GCAGGGCGAAAAGTTTAAACGTCTGTTTTCTAAGATAGCCAAGTACTCCCCAGCTATTTCCA
TGTTATCACGTAATCATTAGCTGTGCCGGTAGTTAATCTTTATTCTAATTCATTGTTGTTT
TTTTAGCGTGGCAGTCTATTGTTGGATCCTCTTATTCCAATTTATATATATGCCGACATCACA
CACTTATGAATATTCCCTGTTTAAAAGATTTTATTTTGTACCAATGTTTCTCCGTAAATGATG
CAAACATGATAGAGATGTTAGCCTGTCTTTCTTAACCTACTCATGTTTACATACCAAGACAA
GCTTCTTGACAGAAAACCAGCAGTATATAGCAAATTGCTGCAACCTGACAACGTTTATATCTG
TTTTGTAACCTCGTACTGACGGTGCAATTTCTTTTAGTTTGGCCACCCAGAATGGATTGACTT
TCCAAGAGAAGGCAACAACCTGGAGTTATGATAAATGCAGACGGCAGTGGAGCCTCGCGGAC
A

sbe14

743bp

TTATGCCTACGTACATTCTTACAGTTTCTGGTCTCGTGGTTCCTTCATCTCTGACTCTGGCTAT
TTACACTGGGTTCTGAACCTTCTGTGTTGGGATAAATTATCCCTTCTAACATTTTCATATTAAGCC
TTTCAACTAAACTAAATTGCTGATCTACTAGTTGTTGGTCAGTACGATGACCAAATCTTGCTT
GTGTTAACCTACTAATTGTATTGATTCTTACACATTAATGATATGCAGTACATACATTATCCA
TATACAAATTGACATGAAGTTATTTGAAGGCTGTGTTCTTTTGTTAACATGAAGTTATTTTTC
TCTGCATATGATAAATAATAATAGCATTTCACGAATTTCCGATATTTTATCCCGCTTTTCTG
CATTCAAGCATTTTTTATTTCTCGCCTAACATATATAATTTGAACAGTACATGAACGCATTTG
ATCAAGCAATGAATGCGCTCGACGACAAATTTTCCTTCCTATCATCATCAAAGCAGATTGTC
AGCGACATGAATGAGGAAAAGAAGGTAACCTTCAGTCAGGGCACTTGTTCATCATTTGATT
CACTTTTACTCTTAAGAATAGCAACTCTGACTTGTGTGTTTTATGTTACCGAACAAAGGTGAAA
CCAAATCTGTTTTATATGAACCATTGTTATCTGAAAATGGGTTATGGACTGAATCCAACCTCT
TTCCAGGTTATTGTATTTGAACGCGGAGATCTGGTTTTCTGCTTCAATTT

Hw7/Hw6

517bp

CCGAACAAGGTGAAACCAAATCTGTTTTATATGAACCATTGTTATCTGAAAATGGGTTATGG
ACTGAATCCAACCTCTTTTCCAGGTTATTGTATTTGAACGCGGAGATCTGGTTTTCTGCTTCA
ATTTCCATCCCAATAAACTTATGATGGGTAACCTGATCTCTTGCAAGCTTTGCCTTTCAATAT
TTCTTCTGCTTAATGTCTCGTGTGCTTAATCTGATTTCCACTTTTAAAACACGCAGTTACAAA
GTCGGATGTGACTTGCCTGGCAAGTACAAGGTAGCTCTGGACTCCGATGCTCTGATGTTTGG
TGGACATGGAAGAGTAAGCAATGTTCAAGATCTGTTTTGCGCACCTATATTCTTCTATAGAA
GGGGCCATCAAGGCTGCATCAGATAATCTTATTTGCAGTGTTAACCTGTGCTGCATCACAGG
TGGCCCATGACTCAGATCACTTCACGTCACCTGAAGGAGTACCAGGAGTACCTGAAACAAA
CTTCAACAACCGCCCTAAC

Hw8

531bp

TCACACCGCCCTACTCATTCAAATCCTGTCTCACCCCGCACTTGTGTGGTAATGCTGATTACT
TGGAGGATTTAGTAATAAATGATTAACAGCAACAGAAAACCGCAGCACAACTCACAACT
GCTCTTGTGTCAGGCTTACTACCGCGTCGAGGAAAAAACGGAGAAGCCTAAGGATCAAGGA
GCTGCTTCTGGGGCAAACTGCTTTTCGGGTACATCGATGTTGAAGCTACTCGCGTCAAAGA
CGCAACAGATGGAGAGGCAACTTCTGGTTCTGAAAAGGCCTCGACGGGGGGTATTCCAGC
AAGAAGGGAATTAACCTTGTCTTCCGGTCACCCGACAAAGACAACAAATAAGCACCATATC
ACCGCTTGATCAGGACCGTGTATCGGTGTCCTTGTAAATACCCCTGCTATTGCTAGTAGTAGCA
ATACTGTCAAACCTGTCAAACCTGAGATTCTGGCTTGGACTTTGCTGAGGTTACCTGCTATAC
AAACTGCATGAATAGCTCTATATAGAAAGATAAATA

GBSSI2 639bp

CTACCTCAAAGTACTGCAATGTGCACTCTGAACAAGTTGAAATCTTCTTGAGAGCAACGG
ATGATCAGGATTTTTCTTGTATCTTGGTGCCGCCCGCCCGTGTGCGCGCCGTGCAGGGGAAGA
CGGTGGTGTTCGTGTGCAACGACTGGCCACGGGCCTTCTGGCCTGTACCTTAAGAGCAAC
TACCAGTCCAATGGCATCTACAGGACGGCCAAGGTTTTGAAATTTGCATCTTTTGAATCTACT
TGTCGTCCATACTGAACTTAATCCTGGAAGCATCTGATTTTGCTAGGTGGCCTTCTGCATCCA
CAACATCTCGTACCAGGGCCGCTTCTCCTTCGACGACTTTAACGCAGCTCAACCTGCCCAGC
AGGTTCAAGTCGTCCTTCGACTTCATTGACGGCCACGACAAGCCCGTGGAGGGGGCGCAAGAT
CAACTGGATGAAGGCCGGGATCCCGCAGGCCGACAAGATTCTGACGGTGAGCCCCTACTAC
CCTGAGGAGCTCATCTCTGGCGAAGCCAGGTGCTGCGAGCTCGACAACATCATAACGCTCAC
GGGATCACCGGAATCGTCAACGGCATGGACGTCAGTGAGTGGGACAATACCAAGGACAAG
TTCCTCGCCGTCAACTATG

GBSSI4 750bp

TCGGTCAGGCCGACCTAAGGAATGATCGGATGCATTGCAGGGCACCGGGAAGAAGAAGTTC
GAGAAGCTACTCAAGAGCATCGAGGAGAAGTTCCCCAGCAAGGTGAGGGCCGTGGTCCGGT
TCAACGCGCCGCTGGCTCACCAGATGATGGCCGGCGCCGACGTGCTCGCCGTCACCAGCCGC
TTCGAGCCCTGCGGCCTCATCCAGCTCCAGGGGATGCGCTACGGAACGGTGAACGCCCTCCT
CCTTCCGTCCTTCTTGCCAGCTCCTTTGCATATCCATGGCCATGACCCAAGTTTCTTCCAAATT
TTCAGCCGTGCGCGTGCAGCGTCGACCGGGCTCGTCGACACCATCGTGGAGGGCAAGAC
CGGGTTCCACATGGGCCGTCTCAGCGTCGACGTATGCTCATCGACCCTTGTGTAAATTCAT
TCATCTTGCTCATGGTTGCAGCTCGATCAGACCATGAAATGGTTACCTTTTTCTTGTGGTGG
CCAGTGCAACGTGGTGGAGCCGGCGGACGTGAAGAAGGTGGTGACCACCCTGAAGCGCGCG
GTCAAGGTCGTCGGCACGCCGGCGTACCATGAGATGGTCAAGAAGTGCATGATACAAGACC
TCTCCTGGAAGGTACATAATTTCTGGTTCAGGATACACTTCTAGAACAAATTAACAGTTAGG
ACATACATAGCTGCTCGTGTGTTGAGACATCCATTGATGGTGGCTTGCCCATGTTGCAGGGG
CCTGCCA

GBSSIII 235bp

TTTCGTTGCCACTGAAGTGCATCCATGGTGCAAACTGGAGGCCTTGGTGATGTCGTCGGAG
GATTGCCCCAGCTCTTGCTGTAAGTATTCTTGTAACATACTGTAACTCTGAATCACATTA
TTTTTTATTGAGACTCCACTTTTATCACCCCTCTGCCTGTTACTATCTTTGGTGTGATGCACAAC
TCATTTCTTCATAGGCAATGGGGCACCGGTTATGACGATAGCTCC

GBSSII2 531bp

AATTGTACGGGCCTACCAACTCGAACAGACTTCCGAGATAACCAGTTACGGTTCTGACTTTT
GTGCCTTGCTGCATTGGAGGCTCCGAGGGTTCTTACTCTCAATAATTCTGAATACTTCTCTGG
ACCATAGGGAGAAAATGTTGTCTTTGTTGCAAATTTACTGGCACACTCAAGTTTTGCCATGCT
ATTTGAAGAGCATGTATAAGCAATTTGGAATTTATGAGAATGCCAAGAGTTGCTTTCTGCCC
TCACAATATCGCCTATCAGGGCAGATTTCCCCTGAGCGGACTTCGAACTTCTTAATTTACCTG
AAAGATTGTATCGTCTGACGTCGATTTGAATCCGTAGTCTGACGTAGTCCCAAGTAGCTGAC
GTACTGTTTCGTGCCTTCATTTGATTTTGTGGTTGGGCATGTTAAGCCAGTAGTTGGGAGAA
AGATTA ACTGGATGAAGGCAGGGATCAGATGAGTGTGATGTGGTCCATACAGTTAGTCCAC
ATTATGTCAACGAACTCACTTCTGGCCCAGAG

GBSSII3 493bp

ACTTTCTTCACGCCACTGAACAATCTATACATTTATCTTAACCTTGCAATGTTCCACTTGAA
CCATAATAATACTTCAGGTATGGGGCAAACCTGGATCAAAATTGTATGGGCCTACCACTGGA
ACAGATTACCGAGATAACCAGTTACGGTTCTGCCTTTTCTGCCTTGTAAGTATCCAGTTTAGT
TTAAATTTTATGACTAGCATCTCACGTATTTAATTTATAAACCATTTCAATGCTGTGGCCTGT
GGCATAAGCTACATTCTTCCCCTCAAATCAGAAAATTACAAACCCTTGTGTAGCTGAATTA
ATGGTGTGTGTTGGTAGCATTGAAGCGCCTAAATGAATCTAACAGTTACCGAGGGTAGTACA
TTTACATCAATTGAGTATTTTTACATGATATGTTTGTGTAACCTTCTTCTAATCTGATATCGCGT
TTAGGCTGCATTGGAGGCTCCAAGGGTTCTTAACCTCAGCAATTCTGAATATTT

GBSSII4 345bp

ATTTTCTCTCTAACTAACTAAATTACAAACATTCCTCTCTTCAACAGGAGAAAATGTTGTC
TTTGTGCAAATGACTGGCACACTGCAGTTTTGCCATGCTATTTGAAGAGCATGTATAAGCA
AAATGGAATTTATGAGAATGCCAAGGTACACCGTTTCTTCTTTTGTGACAAGTAGGGAA
TGTGCATCATAGGTTTTATTCTTCAGAGATTACCCATACTGTTTTGATTGGTCAATAGTTGT
CCTGTAGGTTGCTTTCTGCATTCAATATCGCATATCAGGGCAGATTTCCAGAGCAGACTT
CGAACTTCTTAATTTACCTGAAAGTTTCATGC

GBSSII5 219bp

AGGTATGTTGAGTTGGATGGCGACCTTCGTGCAAAGCCTCTTGAAACTGGAATTGTAAATGG
AATGGATGTTGGTACTGTACTGCTGATCGTCAGTCGGGTTAAGGTAGCTTCGGATGCGATGC
ATGACGTTAAGGGGATGACCTGAGAGCTCTCAATAAAGAAATACTGAAGGTTGAAGTTGGA
GTGCCGTGGACTCTTCGCATACCTGATATAGTT

GBSSII7 238bp

TTTCATTGGTCGCCTTGAGAACAGAAAGGGTCAGACATACTAATTGCAGCCATTCCGGAGTT
TGTTGAGGAGAATGTTTCAGATAATTGTTCTCGTATGTTTATTTTGAAAGAGAATTATAATGCA
CTCATAACGGCATGGCAGGAGATATAAGATGATTGTTGCTTAGCTAAATTGTGTTGTGTTCTTC
AGGGCACAGGGAAGAAGAAAATGGAGGAGGAACTGCTGCTGCTAGAAGT

GBSSII9 349bp

GGGATGAGATATGGAGTGGTAAGCGTTCGACTCGATCAATTAGACGTTAAATTTGACCGCA
CAAGTATTGATTGTCCCAGTTGACACAGTCCTTGATATTACATTTTACAGATTCCCATCTGTG
CATCCACCGGAGGACTTGTGACACGGTGAGGGAGAGTGTACCGGATTCCACATGGGTTCG
TTCAATGTCGAGGTAAAGAACAATATAGGCTTGGTCTAAGTATTTGCTCGCAAATGTCGATG
CATTGATGATTGATAGCCTTGATCTATCCTCTGTAGTTTGAAACCGTCGATCCAGCAGATGT
CGCGGCAGTCGCTTCGAATGTCACACGAGCTCTGAA

ADP5 261bp

AGGTGCGCAAATGCGGCGCTTCTTGACCGGGCCGCCTAGTCTTGTCTCGCCGCTCTGATCCG
TTGCGTCCGTATCTTTCTGATGAGAATTTGACACATGCGGGAAATTATTGCCTGGGTAATTT
AGATGCGCAAATGTGGTTCACGTCGTGAGTTCTCATGTGAATATTTCTTAGAGATGATCAAA
AAATACTACTCTACTTTGCTAGCGCATAACACGAGCTTTCTGGTGACTAATCATGTGGACATT
TTCATTGGCTC

ADP6 704bp

TCTTGGATTCTTTTTCTTTTAACTTGTTTCAGTTTTCTTCTTTGAGTTTTGCTTTAGTACACCCCT
TTTAAAGACATTACGATTACGGATGTGGTGGAGATTAAACTTGCCCTTTCATTTTAATTTAA
AAGGGTAGGAGAGTCTATCCCACGTGGTGCAAATCAATGGTGGTTGCCTCTCTTCCTCACAA
ATCGTTCTGACATCAACACAATAAACAAGTAACACAACCAGGTGAGTTTTAGGCGATGAT
AGATTGGGGTCTTCTGTGCTGATGGAAGACTCTATTTGATGTGAAAAAGTTATACACAACAG
GAAGAACTTGAATCATGTCTCAGCTGCTATGCTGATTGAGACATCTGACGTCCAATTAACC
CATATTCGAAAGAAAAAACTGAACATAAGTTTCAGCTTGATTGATAAATAAAAGGTCAGAA
CTATTCACCAGCCAGCCGCTCATTATCTACAAAAGATTGGTAGACATTGTACCTCCAATTTAT
TGGATAAACTTGTTGCCCATGTTCCATTTCGTTCCATGATCTCTGTTGGTGATAAACAAGCTG
AACTCAATGCCAACCGCCTGGAACACTTGTTTCTTCATTCTTTGTTTGATTACTTTGCAATA
GGCAATTGATGAGTTTCTGCTGTTTGTGCAGAGTGTCTCGGAATTATTCTTGGAGGTGGGGC
AGGGACTAGATTGTA

ADP8 659bp

ATAATTTAATAGCATACTATCACAAGACAGTTTTTTAGCTCAAGTAGAGATGCTCAGAAATTT
TCACAAATTGATTTTAACAGTGTCTTCTGAATTATACGAATCTGTTTTGTGTACCAGGATCTGG
TCCTGAACAAGTTCAGTACGAAATTTAGAATTAGTAATTTAGTATACGTGAATGGTTAG
TGATGTAACCTTTGATTTTGATTCTTATGAGCATTAGCCAGCCATCATCATTTATAAGTAAACA
TAGCAGATCAAACCTATGTTTCATACTTTGATATGTTTGCCGTTATAACATACTATTCATCATA
GTTTTTGGTTTAGATTGTGAGTGCTATACCACACAGCTACATGCAGTTTCTGCTAGTTTACGT
CAAACCAGTACCCTACAGCGTTTTGCTAGATAATAAGAACCAAAGTCATGTCCGTGAGCTCT
GCTATGTTCACTTCTTGATGATCCACTCCCCTAACAAAGTGAGCTCTGCTCACTTCTTGATGA
TCATAAACCTTTCTTATCAACATAAAGTGTTGCTAGGGTCCCATGCAAGCTTTTGTAGGGTAT
TCACTTTGTCTTATCATCTTATCTCAGGGTACTGCAGATGCTGTAAGGCAGTACTTGTGGCTA
TTCGAGGAGCATAATGTTATGGAGTATCTAAT

ADP9 629

CATAATGTTATGGAGTATCTAATTCTTGCTGGAGATCATCTGTACCGAATGGACTATGGGAA
GTTTATTCAGGCACACAGAGATACGGATGCTGATATTACTGTTGCTGCCTTGCCCATGGATG
AGGAACGTGCAACTTTATTTGGCCTTATGAAAATCCTTGAAGAAGGGAGGATAATTGAATTC
GCAGAGAAACCAAAGGAGAACAGATTGAAAGCTATGATGGTACACTGCCACCGTGCCTTT
CTAACTAGTTTCAGATATACAGTTGTGAACCATCATTCATTACACCACAAAATCTCTTCTGTT
GAATGCATTTACACCCTGTTGCTACCTGTATTGGTCTTGTAATGGTACACTGGCGCTGTGCCT
TTCTAACTAATTTACAGATAGTCAGTTGTGAACCATCATTTATTACACCAAAAAATCTCTTGTG
TTGGATGCATTTACACCATGCTGCTGCCTGTTTTGATCTTGTAGGTTGATACGACCATACTTG
GCCTTGAAGATGCGAGGGCAAAGGAAATGCCTTATATTGCTAGCATGGGTATCTATGTTATT
GAGCAAACATGTGATGCTTCAGCTTCTCCGTGAGCAATTTCTGGAGCTAATGACTTCGGAA
GTGAAG

ADP10 319bp

GAGCAATTTCTGGAGCTAATGACTTCGGAAGTGAGGTTATTCCTGGTGCAACTAGCACTGG
CATGAGGGTAAGCAAAGCTCATTGAGTTAGTAGTTTCCTTTTCGCTGCTTCTGCTTTTATGATT
TGAATCATTTTAGCTTCACAGAACTGTTTATCGTTCATGGCATTATAGTTGTGATATGCAG
TTCGGAAGGGGATACAATAGGTTATTGGATATGCAGTTGCATTGGCATTATAGTTGTGATA
TGTGCTTCTTAAGAGTTTTGTTATTGTTGCCGACAGGTACAAGCATACCTATATGATGGTTAC
TGGGAA

ADP13 515bp

ACCCGATTTTCAGGTGTGCCTTCACTTTTTGCCTTGTTGTGGACAAAAATAATGAAATTTTATG
CATGTAAAGTGTTAGAATTGTCTCCTGTTGATTTAATGTATACGTTCAATTTGAATGCAGTTT
CTATGACCGTTCTGCTCCCATTTATACACAACCTCGACACTTGCCGCCTTCAAAGGTTCTTGA
TGCTGATGTGACAGACAGTGTTATTGGTGAAGGATGTGTTATTAAGTAAGTAGCCTTTTTTC
AGTTGGCTCTCCGATGCTAGCCTTCTTCAGGTGTTTCATTTTCATGCTAACAAACTTTAAGCT
TTTAAAGACATATTTCAAACCATCTATACTTCTTTATGGGCTGTGATTGTTATATCTTCTCTC
AAGTGATTTTTGATGCTGTATGTAATAACGGCTTCTATGTTCCCTCTGCCTTTCTTTGCTGTT
ACGTAGAAGTCAAGATACACCATTAGTAGTTGGACTCCGGTCTGCATATCTGAAGGGGC
ATAATAGAGG

ADP15 797bp

ATTTTCTTTTAGCAACACTGTTTCATTCGTTTTGTTCAAAGGAAAAGTGGAGGAAAGTTCCTTT
GATCACATTTTCGGAAAGAAAATCGCAGGAATTTTATAATCTACTTAGACTTCCATCCTAGTT
ATCGTTCTTCATGTGCTTTGACTTTGATTTGACTGTCTTTAGCGGATGGTTAAGACGTGCTGA
TAATGTCAAGGGAGGTTGGGGTAGACCAAACCTGACATGGGAGGAGTCTCTAAAGAGTGAT
CTGAAGAAGTGAATGTCACCAAAGATTTAGCCATGGACAGGGTCCGTGGAAGTTAGTTG
TCCACTGCCAGAACCATGACTTGGTTTTGATATGGGGTGGATTAACGAGCTGCTCGGCTCGT
TAAGCCCGAGCTCGTTAAGCTTGTGCTCGTTAAGCTCGTTAAGATTAACGAGCAGAAAACCC
AGCTCGGACGGTTCGTTTGAAGCTCGTTAAGCTTGTGAGCGCTCGCGAACGCTCGTTAACAG
ATTATGATGTGTTACAGTCTACAAGATGAGTGTGTAGATGTGGTTTTTAAGAAGGAAGATGA
TGACTACAGAATGAAATGCACTAGTTTGTGCTCCTATGTGGATTTCGAGTGAATAGATGGG
CTGAGGTGCTACGAAAATTTGTCATGTAAGATAAAAATATATGCTGTGTTGTTACTAACAA
GCTTAATGAGCTACTCGTGAAACTCGTTAGCTCGTTTCGTTAAGCTCATTAACTTAACGAGTT
GAAATCGATGATTGGCTCTATCATTAAAGAGGCGAGCCACGAGCTTAACGAGC

sbe2b2 519bp

TACAGTCTTTGATAAGATGCAAATGTCTGCTTGCTGTGACACGAACTTTTGAAGTACGTAG
TCACTCTTGTGTGTTTCATGGTTCTGAGGTGGTAACCGAACAAAAATAGGAAAGTGGCAAGAA
CTGCAATGTGAGCTACCGATAACCACCCATTGTAATTGGGTACACCGATTAATATATGTCTT
GATGGGTTCTATGTTTTTTCAGTATCTGTGCCAATTGAACAACAATGCCACTTCATTTCCCT
GTGTTGCTTTTGTAAAGGATGAAACCCATATGTCCAGATCAAACCTGTACTAGCAGTCTCACTG
TGCCTTAATGGATCAAAAACAGATACAGCCTATATAGGAGAATACGTTTCAGACATTGATGA
ACACGAAGGAGGCATGGATGTATTTTCCCGCGGTTATGAGAAGTTTGGATTTGTGCGCAGGT
GAAATTTCTTACTAGATAAGTATGTATCTACCTTTTCTTTGTATCGTATCTACATTCTCTTC
CCGTGCAGCGCTTAAGGTATC

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mit dieser wissenschaftlichen Arbeit noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen wurden.

Des Weiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Halle/Saale, den 12.11.08

Selbständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich vorliegende Dissertation mit dem Thema: "Züchtung von Industrieroggen zur Bioethanolherstellung" selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle/Saale, 12.11.08

Unterschrift:

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. W. E. Weber für die Überlassung des Themas und die Begutachtung dieser Arbeit danken. Durch seine stetige Motivation und kritischen Anregungen hat er maßgeblich zum Gelingen beigetragen.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. T. Miedaner und Herrn Prof. D. Klaus Pillen, die sich als weitere Gutachter dieser Arbeit zur Verfügung stellten.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Erika Schumann, die mich während der gesamten Doktorandenzeit intensiv betreut hat und mir auch bei persönlichen Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Danken möchte ich Herrn Dr. Peer Wilde, Herrn Dr. Victor Korzun und Frau Brigitta Schmiedchen von der KWS Lochow GmbH sowie Herrn Dr. Heinrich Wortmann und Herrn Dr. Franz-Joachim Fromme von der HYBRO für die Bereitstellung des Züchtungsmaterials. Sie haben bei zahlreichen Treffen mit kritischen und anregenden Diskussionsbeiträgen zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus gilt mein Dank den technischen Mitarbeiterinnen Sandra Barth, Regina Voss, Helga Sänglerlaub und Roswitha Ende, die mich bei der Erfüllung praktischer Aufgaben unterstützten.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Wehling und Herrn Dr. Bernd Hackauf. Sie ermöglichten mir die Durchführung von Laboranalysen im Julius Kühn-Institut, Groß Lüsewitz.

Des Weiteren danke ich meiner Kollegin Frau Christiane Kelm, die durch ihre stetige Anteilnahme und Unterstützung einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat.

Außerdem möchte ich meinen Eltern, Bettina und Klaus-Dieter Rode, herzlich danken. Ohne ihre liebevolle Unterstützung wäre mir die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) sowie dem Bundesverband deutscher Pflanzenzüchter e.V. (GFP) danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jeannette Rode
Geburtstag und -ort: 5. Mai 1980 in Halle/Saale

Schulausbildung

1986 – 1991 POS Dorothea Erxleben, Halle/Saale
1991 – 1997 Christian Thomasius Gymnasium, Halle/Saale
1997 – 1999 Torgymnasium, Halle/Saale
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 1999 – September 2000 Institut für Biologie,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Oktober 2000 – August 2004 Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Hauptfach: Pflanzenwissenschaften
Thema der Diplomarbeit: “Genetische Kartierung
von Mikrosatelliten-Markern in Hanf (*Cannabis
sativa* L.)”
Abschluss: Dipl.-Ing. agr.

Praktika

Juli 2002 – Oktober 2002 Agrargenossenschaft Holleben
Juli 2003 – Oktober 2003 KWS Lochow GmbH, Bergen-Wohlde

Berufstätigkeit

Oktober 2004 – Oktober 2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Agrar und Ernährungswissenschaften, Professur
für Pflanzenzüchtung, Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Januar 2007 – Juli 2007 Trainee bei Monsanto Agrar Deutschland GmbH
August 2007- Juli 2009 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für
Resistenzforschung und Stresstoleranz, Julius
Kühn-Institut, Quedlinburg
Seit August 2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Agrar und Ernährungswissenschaften, Professur
für Pflanzenzüchtung, Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg