

Markergestützte Selektion der optimalen DH-Linie Marker-assisted selection of the optimal DH-line

Wolfgang Link^{1*} und Heiko C. Becker¹

Abstract

A marker-assisted identification of optimal doubled-haploid (DH) lines from bi-parental crosses is the more tempting the more relevant genes are available for marker-based selection. Yet, the number of lines that have to be developed to allow an optimal line to occur in a cross increases in parallel. For combining 6 or more genes the usually developed number of DH-lines is far too small. For instance, a DH-line that combines N=6 unlinked genes in optimal combination occurs on average once among 64 lines, and it needs a sample of 293 such lines to end up with at least one optimal line in 99% of cases. A line that combines N=8 genes asks for a family of 1.177 instead of 293 - far more than the 50 to 200 lines that are usually produced. An efficient proposal is to prepend a step of 'F₂-enrichment' prior to striving for the ultimate, optimal DH-line. So-called 'useful' F₂-plants that - instead of the F₁ - may serve as sources of optimal DH-lines, are far more frequently occurring than optimal DH-lines do; the relation is $(3/4)^N/(1/2)^N$, which for e.g. N=8 is about 26 in favour of such 'useful' F₂-plants. Further considerations and useful references are presented.

Keywords

Doubled-haploid line, marker-assisted selection, optimal DH-line

Was soll man sich unter einer optimalen DH-Linie vorstellen?

Aus einer Kreuzung von zwei homozygoten Linien erhält man eine F₁-Hybride, die an denjenigen Loci heterozygot ist, an denen die Eltern unterschiedliche Allele tragen. Entwickelt man aus den Gameten dieser F₁ doppelt-haploide (DH)-Linien, so ist diese Familie von Linien an ebendiesen Loci polymorph. Diejenige der DH-Linien die den „besten“ agronomischen Wert hat kann man als optimal bezeichnen.

Heute stehen für zunehmend mehr relevante Loci molekulare Marker zur Verfügung (MACKAY et al. 2009). Wir gehen hier vom günstigsten Fall aus, also von co-dominanten und perfekten Markern (0 cM Abstand zum Ziel-Locus, Allelspezifischer Marker); außerdem von freier Rekombination aller betrachteter Merkmalsloci- bzw. Markerloci-Paare. Ist die Kopplung zwischen Marker und Ziel-Gen nicht

perfekt, dann lohnt es sich, zwei flankierende Marker pro Ziel-Gen zu benutzen. WANG et al. (2007) berichten, wie bei dem Versuch, das Allel *Glu-A3* (Kornspeicherprotein in Weizen) mit dem Allel *tin* (Bestockung) zu kombinieren, nur knapp 15% der resultierenden Linien die entsprechende Gen-Kombination aufwiesen, und dass diese Linien nur 80% statt 100% der markerbasiert selektierten Linien waren. Der Grund war die in Repulsion vorliegende Kopplung (3,8cM) zwischen *tin* und *Glu-A3* (für *Glu-A3* wurde ein perfekter Marker benutzt) und ein 0,8cM Abstand zwischen dem Locus für *tin* und seinem Mikrosatelliten-Marker.

Kennt man für eine Anzahl N relevanter Loci den Marker des jeweils gewünschten Allels, dann kann man diejenigen DH-Linien, die an allen diesen Loci für den gewünschten Marker und also für das gewünschte Allel homozygot sind als optimale DH-Linien betrachten. Betrachtet man beispielsweise N=3 solche Loci in einer Kreuzung, dann erwartet man, dass $(1/2)^3 = 12,5\%$ aller DH-Linien aus dieser Kreuzung zu den optimalen DH-Linien gehören.

Tatsächlich ist der Vorschlag, DH-Linien für die Pflanzenzüchtung einzusetzen inzwischen über 60 Jahre alt (CHASE 1949). MELCHERS und LABIB (1970) bezeichneten den Einsatz von DH-Linien als „neuen Durchbruch für die Pflanzenzüchtung“. Nur wenige Jahre später konnten z.B. beim Raps mittels Antherenkultur Haploide erzeugt werden (THOMAS und WENZEL 1975), und als kurz darauf gezeigt wurde, dass und wie man auch aus Mikrosporen des Rapses haploide Pflanzen erzeugen kann (LICHTER 1982), war der Weg für die routinemäßige Anwendung dieser neuen Technologie vorgezeigt.

Selbst beim Raps wird aber die DH-Technik bisher nur begrenzt eingesetzt. Eine Umfrage von MÖLLERS und IQBAL (2009) bei den deutschen Rapszüchtern ergab, dass einerseits alle Züchterhäuser die DH-Technik einsetzen, dies jedoch andererseits nur (im Mittel) in 30% ihrer Kreuzungen. Die in der Umfrage genannten Schwierigkeiten sind zuallererst der niedrige Samenertrag der primären doppelt-haploiden Pflanzen. Des Weiteren werden häufig Probleme bei der Diploidisierung und Regeneration genannt.

Was sind die Gründe, DH-Linien in der Züchtung zu erzeugen?

Die Nutzung der DH-Technologie bringt, so wird argumentiert, dreierlei: (1) Beschleunigung der Züchtung, (2) höheren Selektionserfolg, und (3) Einsparung in den Po-

¹ Georg-August-Universität Göttingen, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Von Siebold Straße 8, D-37075 GÖTTINGEN

* Ansprechpartner: Prof. Dr. Wolfgang LINK, wlink@uni-goettingen.de

pulationsumfängen, die man bearbeiten muss. Eine Zeiterparnis durch den Einsatz von DH-Linien ist unbestreitbar, dies können bei Winterraps 1 bis 2 Jahre sein. Sogar wenn man in einer Standard-Variante der DH-Technik - aufgrund des beklagten geringen Samenansatzes der primären DH-Pflanzen - eine Vorvermehrung einschieben muss, kann man die Sortenkandidaten ein Jahr früher als ohne DH-Technik (konventionell) zur offiziellen Prüfung anmelden (*Tabelle 1*, PAULMANN und FRAUEN 1991). Das Argument eines höheren Selektionserfolges bezieht sich entweder auf den Vergleich mit einer konventionellen Pedigree-Methode oder mit einer Einzelkornramsch-Methode (single seed descent, SSD), wie sie ja häufig in der Züchtung von Selbstbefruchtern eingesetzt wird. Dabei ist ein höherer Selektionserfolg pro Zeit schon dann gegeben, wenn nur der Züchtungszyklus durch Nutzung der DH-Technik kürzer ist; auf den Zeitgewinn haben wir uns oben schon verständigt. Außerdem ist zwischen den homozygoten DH-Linien oder SSD-Linien eine größere genetische Varianz gegeben als zwischen den F_2 -Individuen. Beide, die Linien aus DHs bzw. SSDs und die F_2 -Individuen sind jeweils die früheste Generation, die eine Auslese erlaubt. Wenn für ein bestimmtes Merkmal strenge intermediäre Vererbung vorliegt, dann haben wir zwischen F_2 -Individuen halb so viel genetische Varianz wie zwischen DHs oder SSDs. Das entspricht der bekannten Tatsache, dass Mittelwerte eine kleinere Varianz haben als Einzelwerte: die Werte der F_2 -Individuen stellen für jeden Locus die Mittelwerte der beiden zufällig gezogenen Gameten dar, die andererseits allein, ohne „Vermischung“ mit anderen Allelen, der haploide Ursprung je einer der homozygoten Linie sind.

In erster Näherung, insbesondere wenn man Kopplung ignoriert, ist eine Familie von DH-Linien identisch mit einer Familie von SSD-Linien. Man muss jedoch auch beachten, dass die SSD-Linien mehr Zeit zu ihrer Erzeugung brauchen und - je nach Generation - noch einen kleinen Anteil restlicher Heterozygotie aufweisen. Liegt Kopplung zwischen den Loci vor, so ist die Varianz zwischen DH-Linien größer oder kleiner als zwischen SSD-Linien (SNAPE 1976). Größer, wenn die Kopplung überwiegend allele Gene in 'coupling' Phase zusammenhält („gut mit gut“), und kleiner, wenn die Kopplung Gene in 'repulsions' Phase zusammenhält („gut mit schlecht“). Da häufig diese

Tabelle 1: Zeitersparnis durch Einsatz der DH-Technik in der Winterrapszüchtung (schematisch, nach PAULMANN und FRAUEN 1991)

Table 1: Saving of time by the use of doubled-haploid technology in winter rapeseed breeding (PAULMANN and FRAUEN 1991)

Jahr	Konventionell	Methodische Alternativen	
		DH (Standard)	DH (Schnell)
1	Kreuzung	Kreuzung	Kreuzung
2	F_1	DH-Produktion	DH-Produktion
3	F_2 Beobachtung	Vermehrung	DH Beobachtung
4	F_3 Beobachtung	DH Beobachtung	LP Ertrag
5	F_4 LP Ertrag	LP Ertrag	LP Ertrag
6	F_5 LP Ertrag	LP Ertrag	Anmeldung
7	F_6 LP Ertrag	Anmeldung	
8	Anmeldung		

Phasen nicht exakt bekannt sind, ist diese Betrachtung eben häufig rein theoretischer Natur. Man kann allerdings davon ausgehen, dass bei einer Kreuzung des Typs Elite \times Exot durch die theoretisch bis zu doppelt so hohe Chance für die meiotische Rekombination, die die SSD-Linien bieten (HALDANE and WADDINGTON 1931), das Elite-Genom mit dem exotischen Genom stärker rekombiniert wird, so dass Linien mit intermediärem Charakter häufiger auftreten und die Varianz zwischen den Linien kleiner wird als es bei einer solchen Kreuzung nach nur einer Meiose für DH-Linien der Fall sein wird. SMITH et al. (2008) fanden bei Mais ($x=10$ Chromosomen), dass 37% der DH-Linien vier oder mehr elterliche Chromosomen noch intakt enthielten, wogegen das nur bei 13% der SSD-Linien der Fall war. Die dadurch höhere Varianz zwischen DH-Linien kann in diesem speziellen Fall ein Vorteil sein: wenn es nämlich darum geht, Linien zu finden, die außer einem Chromosom des Exoten-Elters alle anderen Chromosomen des Elite-Elters tragen. Will man aber aus dem exotischen Chromosom nur ein einzelnes Gen übertragen haben (minimaler 'linkage drag'), dann wird eine innige Rekombination zwischen Exot und Elite gebraucht, wie sie in DH-Linien nicht zustande kommt. Tatsächlich würde man in diesem Fall eher eine Rückkreuzung durchführen, um dann DHs oder SSD zu erzeugen (siehe z.B. FRISCH und MELCHINGER 2007).

Man muss eine kleinere Anzahl primärer DH-Pflanzen pro Kreuzung erzeugen und analysieren, um das Auftreten des gewünschten optimalen Genotyps zu ermöglichen, als man F_2 -Individuen pro Kreuzung erzeugen müsste (*Tabelle 2*). Zum einen ist die Häufigkeit eines bestimmten Homozygoten in F_2 nur 1/4 pro Locus, also bei N (ungekoppelten) Loci $(1/4)^N$; dagegen ist diese Häufigkeit bei DHs (oder SSDs) 1/2. So tritt in einer Kreuzung, in der beispielweise 8 Loci segregieren, eine optimale Linie im Mittel einmal in 256 Linien auf - ein möglicherweise noch darstellbarer Populationsumfang. Eine solche optimale, 8-fache Homozygote tritt zwar auch als F_2 -Pflanze auf, aber im Mittel nur einmal in einer Population von über 65 000 Individuen. Nun wird allerdings nicht in jeder konkreten Familie von 256 primären DHs exakt einmal diese optimale DH auftreten. Um einigermaßen sicher zu sein, dass sie in einer konkreten Kreuzung auch wirklich wenigstens einmal vorkommt muss man die Populationsgröße über 256 hinaus erhöhen. Betrachten wir nur einen spaltenden Locus, dann sind 50% der DH-Linien optimal. Die Wahrscheinlichkeit, dass die erste aus einer großen Zahl von DHs falsch ist, beträgt also 0,5. Die Wahrscheinlichkeit, dass die zweite DH falsch ist, beträgt ebenso 0,5; und die Wahrscheinlichkeit, dass beide zugleich falsch sind, ist $0,5^2$. Analysieren wir sieben DH-Linien, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass alle sieben zugleich falsch sind, nur noch $0,5^7=1/128=0,0078$ und somit knapp unter 1%. Wir können also mit gut 99% Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass in einer Serie von sieben DH-Linien doch wenigstens eine optimal für den Locus ist. Betrachten wir nunmehr acht Loci zugleich, so muss $[1-(1/256)]^N$ kleiner als 1% werden, und das ist für $N=1.177$ gerade der Fall. Statt exakt 256 DH-Linien muss man also zur Sicherheit deutlich über 1000 DHs haben, um mit großer Wahrscheinlichkeit eine ganz bestimmte, für acht Loci optimale DH dabei zu haben. Wenn das auch

Tabelle 2: Mindest-Populationsgröße (F₂-Pflanzen, primäre DHs), um einen erwünschten homozygoten Genotyp zu erhalten (α = 0,01) (verändert nach JANSEN 1992, MÖLLERS und IQBAL 2009)

Table 2: Minimum population size (F₂-plants, primary DH lines) to achieve a desirable homozygous genotype (α = 0,01) (modified after JANSEN 1992, MÖLLERS and IQBAL 2009)

Loci	F ₂				DH	
	Häufigkeit φ „Optimal“	Mindest-Population „Optimal“	Häufigkeit φ „Brauchbar“	Mindest-Population „Brauchbar“	Häufigkeit φ	Mindest-Population „Optimal“
1	1/4	16	3/4	4	1/2	7
2	1/16	72	9/16	6	1/4	16
3	1/64	292	27/64	9	1/8	35
4	1/256	1177	81/256	13	1/16	72
6	1/4096	18861	729/4096	24	1/64	293
8	1/65536	301803	ca. 1/10	44	1/256	1177
16	1/4,295 Mrd	19,85 Mrd	ca. 1/100	458	1/65536	301803
N	φ = (1/4) ^N	M*	φ = (3/4) ^N	M	φ = (1/2) ^N	M

* M = log(α)/log(1-φ)

eine große Zahl ist, ist eine solche Homozygote in F₂ nur bei völlig unrealistischen Populationsumfängen (hier bei N=301 803) zu erwarten (Tabelle 2). Dieser Vorteil der DH-Linien über die F₂-en ist unbestreitbar.

Bei der Berechnung einer notwendigen Populationsgröße von 1177 DHs zur Kombination von acht günstigen Allelen war die Annahme, dass man nur eine einzige optimale Linien selektieren möchte. Diese wäre aber sicherlich für sonstige, nicht markergestützt selektierten Eigenschaften noch nicht optimal. Es wäre daher nötig, mehrere, vielleicht 20 solche Linien zu erzeugen, damit man für weitere Eigenschaften wenigsten noch eine gewisse Auswahl hätte. Dafür müsste man nun wesentlich mehr, im Beispiel konkret über 8144 DH-Linien erzeugen - was wiederum in eindeutig unrealistische Größenordnungen führt.

Nach der vorhin erwähnten Umfrage von MÖLLERS und IQBAL (2009) erzeugen die deutschen Rapszüchter Populationsumfänge von 50 bis 200 DHs pro Kreuzung. Diese Anzahlen sind nach der hier verfolgten Argumentation weit unterhalb dessen was notwendig ist, um auch nur für eine geringe Zahl von Genen eine Linie mit optimaler Kombination mit einiger Sicherheit zu erzeugen und zu finden.

Ist es richtig, auf direktem Weg nach der optimalen DH-Linie zu suchen?

Bei DH-Linien sind wie gesehen pro spaltendem Locus 50% optimal und 50% falsch. In F₂ ist die Situation weniger eindeutig. Zwar sind nur 25% optimal. Aber immerhin 50% der Pflanzen sind weder optimal noch falsch. Sie enthalten einerseits zwar das erwünschte Allel, andererseits aber nur heterozygot. In ihren Selbstungsnachkommen finden sich unter anderem auch die gesuchten Optimalen.

Somit ergibt sich das Konzept der sogenannten „brauchbaren“ Genotypen (siehe z.B. WRICKE und WEBER 1984, S. 28, Tab. 1.12). Dieses sind solche, die entweder schon optimal sind oder aus deren Selbstungsnachkommen noch Optimala herauspalten können. Hier zeigt sich ein günstiges Faktum in F₂: je spaltendem Locus sind 75% der Individuen brauchbar, mehr als bei DH-Linien (wo es den Unterschied zwischen Brauchbar und Optimal gar nicht gibt). Dadurch kann man, als Beispiel, aus einer Stichprobe von nur 44 F₂-Pflanzen mit hoher Wahrscheinlichkeit mindestens eine

für 8 Loci gleichzeitig brauchbare F₂-Pflanze erwarten (Tabelle 2, Abbildung 1), im Vergleich zu der oben genannten Stichprobengröße von 1177, die man bei der Suche nach einer optimalen DH-Linien einsetzen müsste.

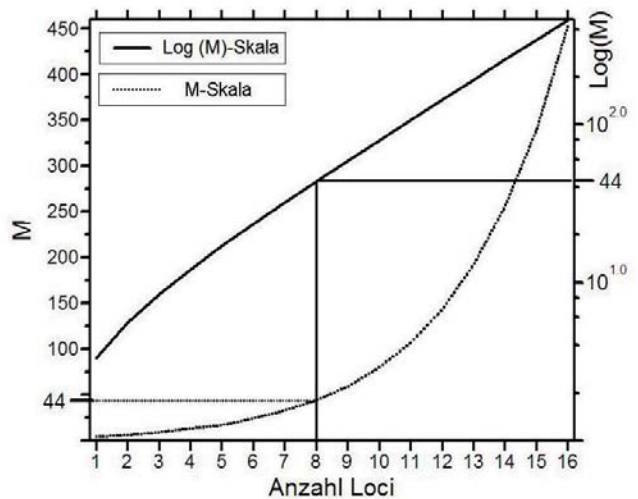


Abbildung 1: Zusammenhang zwischen der Anzahl betrachteter Loci und der Mindest-Populationsgröße in F₂, um mit 99% Wahrscheinlichkeit wenigstens eine „brauchbare“ F₂-Pflanze zur Verfügung zu haben (vergl. Tabelle 2)

Figure 1: Relationship between number of loci and minimum F₂ population size to achieve with 99% probability at least one „suitable“ F₂-plant (see Table 2)

Zusammenfassend ist zu sagen:

- (1) Bei beispielsweise acht oder mehr Loci treten optimale Genotypen in einer F₂-Familie praktisch nicht mehr auf, sie sind aber auch in einer DH-Population selten (eine von 256 DH-Linien oder seltener)
- (2) Dagegen treten **brauchbare** Genotypen in einer F₂ relativ häufig auf (bei acht Loci ca. 10% der Pflanzen; (3/4)^N= 0,1001)
- (3) Leider kann man aber diese brauchbaren Genotypen an F₂-Einzelpflanzen visuell kaum erkennen.

Dies ist das Eintrittstor für die DNS-Marker. Nehmen wir eine höhere Anzahl markierter Loci, z.B. N=16. Damit kann man in F₂ ungeachtet der teilweisen Heterozygotie und natürlich ungeachtet irgendwelcher Umwelteffekte

die brauchbaren F_2 -Pflanzen eindeutig erkennen und als Quelle von DH-Linien nutzen (F_2 -enrichment, WANG et al. 2007). Anstatt nun eine aus 4,295 Milliarden F_2 -Pflanzen als optimalen Genotyp zu identifizieren, und anstatt eine aus über 65000 DH-Linien als optimale Linien zu identifizieren (Tabelle 2), identifizieren wir brauchbare F_2 -Individuen, die zu 1,002% vorkommen. In unserem Beispiel sollten wir dazu mindestens 458 F_2 -Pflanzen durchmustern.

Unter den brauchbaren F_2 -Individuen gibt es eine deutliche Variation für den Grad ihrer Brauchbarkeit. Man findet zum Beispiel, dass ein knappes Achtel (exakt 0,1265) unter ihnen an 8 oder mehr der 16 Loci schon optimal sind (Abbildung 2). Im Mittel ist also eine aus acht F_2 -Pflanzen zumindest halb optimal. Um mindestens eine solche F_2 -Pflanze tatsächlich zu finden, muss man - in diesem Beispiel - mindestens 34 brauchbare F_2 -Pflanzen untersuchen. Sinnvoll (s.u.) wäre es, mindestens 50 zu untersuchen. Dadurch bekommt man (mit 99% Wahrscheinlichkeit) mindestens zwei solche F_2 -Pflanzen (was die Entwicklung von DHs erlaubt, die für ihr Restgenom stärker verschieden ausfallen).

Für die restlichen acht Loci, an denen unsere brauchbaren F_2 -en ja immer noch nur heterozygot sind, gelten die Angaben in Tabelle 2 für acht Loci. Also beispielsweise, dass man, wenn die brauchbare F_2 noch an sechs oder acht der 16 Loci aufspaltet, man $N=293$ oder $N=1117$ DHs daraus entwickeln muss, um mit 99% Wahrscheinlichkeit die erwünschte optimale DH zur Verfügung zu haben. Allerdings mit der Besonderheit, dass die DH-Linien, die aus einer F_2 -Pflanze entwickelt werden, für das restliche Genom nur noch halb so viel genetischer Varianz aufweisen wie das für DHs aus einer F_1 der Fall ist.

Hat man optimale DH-Linien aus verschiedenen F_2 -Pflanzen erzeugt, kann man diese kreuzen, was im weiteren Verlauf eine entsprechend größere genetische Varianz in den Nachkommen verspricht als wenn sie dieselbe Ausgangs- F_2 hätten; wobei diese Nachkommenschaften dann für diese 16 Loci optimal fixiert wären und die weitere Züchtung dann wieder ohne Einsatz von Markern oder markergestützt zugunsten weiterer, zusätzlicher Loci ablaufen kann. Ratsam

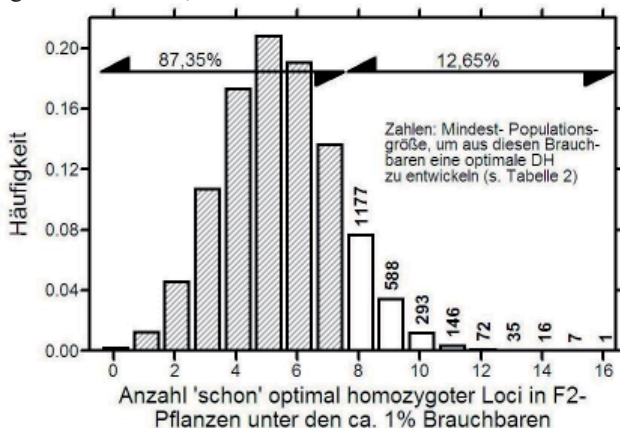


Abbildung 2: Häufigkeit von F_2 -Individuen, die für 0 bis 16 Loci von insgesamt 16 spaltenden Loci schon optimal sind (also für das jeweils bessere Allel homozygot), unter den ca. 1%, die für alle 16 Loci brauchbar sind (siehe Text)

Figure 2: Frequency of F_2 -individuals which are already suitable (homozygous for the desired allele) for 0 to 16 loci of a total of 16 segregating loci among the approx. 1% of genotypes which are suitable for all 16 loci (explanations see text)

wäre, solche DHs aus brauchbaren F_2 -en verschiedener Kreuzungen herzustellen.

Die hier vorgestellten etwas vereinfachten Erwägungen führen zu der Schlussfolgerung, dass

- die üblichen Anzahlen von DHs pro Kreuzung zu klein sind, insbesondere wenn man für eine zunehmende Anzahl wichtiger Loci und QTLs markergestützte Auslese betreiben möchte, und
- dass man eher vermittle einer Vorselektion in F_2 zugunsten von brauchbaren Genotypen mit anschließender DH-Produktion zum Ziel kommt als mit dem Versuch, den optimalen Genotyp direkt in der aus F_1 abgeleiteten DH-Familie zu finden. Weitere Hinweise und weiterführende Literatur findet sich unter anderem bei BERNARDO (2009), LANDE und THOMPSON (1990), FRISCH und MELCHINGER (2001) und WANG et al. (2007).

Literatur

- BERNARDO R, 2009: Should maize doubled haploids be induced among F_1 or F_2 plants? *Theor Appl Genet* 119, 255-262.
- CHASE SS, 1949: Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize and its component single cross hybrid and inbred lines. *Genetics* 34, 328-332.
- FRISCH M, MELCHINGER AE, 2001: Marker-assisted backcrossing for simultaneous introgression of two genes. *Crop Sci* 41, 1716-1725.
- FRISCH M, MELCHINGER AE, 2007: Variance of the parental genome contribution to inbred lines derived from biparental crosses. *Genetics* 176, 477-488.
- HALDANE JBS, WADDINGTON CH, 1931: Inbreeding and linkage. *Genetics* 16, 357-374.
- JANSEN RC, 1992: On the selection for specific genes in doubled haploids. *Heredity* 69, 92-95.
- LANDE R, THOMPSON R, 1990: Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124, 743-756.
- LICHTER R, 1982: Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* L. *Z Pflanzenphysiol* 105, 427-434.
- MACKAY TFC, STONE EA, AYROLES JF, 2009: The genetics of quantitative traits: Challenges and prospects. *Nature Rev Genet* 10, 565-577.
- MELCHERS G, LABIB G, 1970: Die Bedeutung haploider höherer Pflanzen für Pflanzenphysiologie und Pflanzenzüchtung. *Ber Deut Bot Ges* 83, 129-150.
- MÖLLERS C, IQBAL MCM, 2009: Doubled haploids in breeding winter oilseed rape. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM (eds.), *Advances in haploid production in higher plants*, 161-170. Springer Science.
- PAULMANN W, FRAUEN M, 1991: Einsatz von biotechnologischen Verfahren in der praktischen Rapszüchtung. Bericht 42. Arbeitstagung der Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtleiter, 173-182. BAL Gumpenstein, Irnding.
- SMITH JSC, HUSSAIN TJ, GRAHAM G, PODLICH D, WALL S, WILLIAMS M, 2008: Use of doubled haploids in maize breeding: implications for intellectual property protection and genetic diversity in hybrid crops. *Mol Breed* 22, 51-59.
- SNAPE JW, 1976: A theoretical comparison of diploidised haploid and single seed populations. *Heredity* 36, 275-277.
- THOMAS E, WENZEL G, 1975: Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Z Pflanzenzüchtg* 74, 77-81.
- WANG J, CHAPMAN SC, BONNETT DG, REBETZKE GJ, CROUCH J, 2007: Application of population genetic theory and simulation models to efficiently pyramid multiple genes via marker-assisted selection. *Crop Sci* 47, 582-590.
- WRICKE G, WEBER WE, 1986: Quantitative genetics and selection in plant breeding. W de Gruyter, Berlin.