

Entwicklung molekularer Selektionsmethoden und Züchtung virusresistenter Ölkürbissorten für österreichische Anbaubedingungen

Projekt NR. L 1089 des BMLF

Abschlussbericht

Zeitraum November 1997 bis Dezember 2000

**mit ausführlicher Darstellung der Arbeiten und Ergebnisse
im letzten Projektjahr 2000**

Berichte der einzelnen Arbeitsgruppen:

IFA-Tulln

Arbeitsgruppe Pfosser

Saatzucht Gleisdorf

IFA-Tulln, Abteilung Biotechnologie in der Pflanzenproduktion**Projektleiter:** T. Lelley**Projektmitarbeiter:** Mag. Silvia Henglmüller, Gertraud Stift, Ing. Martin Pachner**Zusammenfassung**

Ziel des Vorhabens war (1) die Einführung einer genetisch bedingten Resistenz/Toleranz gegen das ZYMV in das österreichische Ölkürbis-Zuchtmaterial (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) und (2) die Entwicklung molekularer Marker für die Selektion auf Virustoleranz im praktischen Züchtungsprogramm. Um diese Ziele zu erreichen, wurden im ersten Projektjahr Kreuzungen zwischen österreichischem Ölkürbis und virustoleranten Zucchiniarten aus Amerika durchgeführt. Zu jener Zeit waren diese Zucchiniarten die einzig verfügbaren Quellen von Resistenz, da wir uns den langwierigen und mühsamen Weg der interspezifischen Kreuzung ersparen wollten. Aufgrund von Literaturhinweisen und persönlichen Informationen wurde angenommen, dass die Resistenz/Toleranz in den amerikanischen Zucchiniarten monogen rezessiv vererbt wird. Die gewonnenen F1-Pflanzen wurden für die Entwicklung toleranter Ölkürbissorten zwei Mal mit den österreichischen Kreuzungseltern zurückgekreuzt und anschließend geselbstet. Nachkommenschaften dieser geselbsten Pflanzen wurden einem Infektionstest mit dem österreichischen Virusisolat unterzogen, um solche zu finden, die für die Toleranz der Erwartung entsprechend 3:1 spalten. Solche Nachkommenschaften wurden in einer größeren Anzahl gefunden, tolerante Pflanzen aus solchen Nachkommenschaften werden derzeit (Stand Dezember 2000) geselbstet. Die Selbstungsnachkommenschaft dieser Pflanzen stellt einen ZYMV-toleranten Ölkürbis dar, mit einem theoretischen Zuchnianteil von noch ca. 12%. Feldversuche, die im Jahre 2001 durchgeführt werden, sollen zeigen, ob in diesem Material Genotypen zu finden sind, die eine direkte Nutzung als Sorte erlauben, oder ob weitere Selbstungen (eventuell Rückkreuzungen) und Selektion für das Auffinden solcher Genotypen noch notwendig sind. Es ist jedoch festzuhalten, dass im Rahmen dieses Projektes es in kürzest möglicher Zeit gelungen ist, das gesetzte Ziel zu erreichen: ZYMV-Toleranz in das österreichische Ölkürbismaterial zu übertragen. Die Entwicklung molekularer Marker für die weitere Selektion ist beim ersten Anlauf erfolglos geblieben. Dabei wurde die Technik der „bulked segregant analysis“ angewandt, 500 RAPD-Primer

wurden an zwei Kreuzungsnachkommenschaften getestet, kein brauchbarer Polymorphismus wurde gefunden. Ein zweiter Versuch mit einer neuen Versuchsanordnung, in welcher die neu selektierten, toleranten Ölkürbisse (mit 12,5% Zucchinianteil inklusive dem Toleranzgen, toleranter Pool) mit den Ausgangseltern (anfälliger Pool) verglichen werden, ist derzeit im Gange. Dieser Ansatz hat bereits Polymorphismen erbracht, die als potentielle Marker betrachtet werden können. Damit besteht die berechtigte Hoffnung, dass noch bis Projektabschluss auch das zweite Ziel des Projektes erreicht werden kann. Dieser Marker kann dann in zukünftigen Selektionsarbeiten, in denen das derzeit vorhandene „Nigerian Local“-Toleranzgen eingesetzt werden soll, verwendet werden.

Einleitung

Anlässlich der 51. Jahrestagung der österreichischen Saatzuchtler in Gumpenstein (21. bis 23. November 2000) wurde über den Verlauf und die bisher erzielten Ergebnisse der am IFA Tulln laufenden Arbeiten im Rahmen dieses Forschungsprojektes berichtet. Das Manuskript für den schriftlichen Bericht dieser Tagung ist als Anhang zu diesem vorläufigen Endbericht beigefügt. Dieser beinhaltet neben der Beschreibung des bisherigen Ablaufs und der erzielten Ergebnisse des Projektes, eine Diskussion über die verwendete Resistenzquelle und über die Vererbung der Schalenlosigkeit im Lichte der wichtigsten Literatur.

Im folgenden wird nur auf die Arbeiten des letzten Projektjahres eingegangen, gegebenenfalls auf Abbildungen und Tabellen in dem Manuskript hingewiesen.

Arbeiten im dritten Berichtsjahr

Arbeiten mit der ersten Rückkreuzungsgeneration

Vier von den 11 Kreuzungskombinationen, die wir im Winter 98/99 das erste Mal zurückgekreuzt haben, wurden im Winter 99/00, ein zweites Mal zurückgekreuzt. Aus dieser zweiten Rückkreuzung wurden drei Kombinationen ausgewählt, um sie im Sommer 2000 im Zuchtgarten der Abteilung zu selbstern (Abbildung 1a, b, c). Nach

Rücksprache mit der Fa. VitroPlant wurde jedoch die Selbstung der einen Nachkommenschaft, die aus einer Kreuzung der amerikanischen Zucchiniorte Dividend mit einem Genotyp der Fa. VitroPlant entstand (VIT x DIV) von der Fa. VitroPlant selbst übernommen. Von der zweiten Nachkommenschaft (SZG x TIG) wurden 60, von der dritten (SZG x JAG) 120 BC2F1-Pflanzen ausgepflanzt, und davon am Ende der Vegetationsperiode insgesamt 156 BC2F2-Früchte geerntet. Die Pflanzen wurden während der gesamten Vegetationsperiode beobachtet. Ihr Entwicklungsverlauf, ihre Morphologie und ihr Verhalten gegenüber dem auftretenden Virusbefall wurde genau festgehalten, ebenfalls Ertrag und Beschaffenheit der Samen hinsichtlich Beschalung (Tabellen 1a und b). Aufgrund dieser Beobachtungen wurden für eine Resistenzprüfung im BFL 50 Selbstungen ausgewählt. Pro BC2F2-Pflanze (Frucht) wurden 10 Pflanzen (BC2F3) herangezogen und mit dem österreichischen Virusisolat infiziert (Abbildung 2a). Diese Prüfung erbrachte eine unerwartet große Zahl von Nachkommenschaften mit einer eindeutigen 3:1 Spaltung für Anfälligkeit und Toleranz (Tabellen 1a und b, siehe auch Tabelle 2 im Manuskript). Die Entwicklung der toleranten Pflanzen war so gut, dass diese aus dem Glashaus des BFL in das IFA-Glashaus überführt wurden, wo sie nach dem Umtopfen in größere Kulturgefäße weiterkultiviert (Abbildung 2b) und derzeit erneut geselbstet werden. Die Pflanzen zeigen zwar deutliche Symptome der Infektion, sie entwickeln sich jedoch weiter, so dass an einigen bereits wachsende Selbstungsfrüchte zu sehen sind (Abbildung 2c). Sollten diese zur Reife gebracht werden können, so wird ein erneuter Infektionstest mit je 10 Nachkommen pro Frucht der geselbsteten Pflanzen zeigen, ob sie wie erwartet homogen (homozygot) für die Toleranz sind. Mit dem Restsaatgut aus solchen Früchten können im Sommer 2001 Feldversuche zur Prüfung der Anbauwürdigkeit dieser Genotypen angelegt werden.

Dieses Vorgehen weicht von unserem ursprünglichen Plan ab. Sollte die Infektion in unserem Glashaus später doch noch überhand nehmen und die Selbstung dieser Pflanzen zu keinem Erfolg führen, haben wir immer noch genügend Zeit vom Restsaatgut der BC2F2-Pflanzen, die in der Resistenzprüfung Spaltung gezeigt haben, neue Pflanzen heranzuziehen und diese zu selbsten. In dem Fall werden Nachkommenschaften dieser Selbstung im Frühjahr 2001 einem Infektionstest

unterzogen. Mit dem Restsaatgut jener Nachkommenschaften, welche sich bei diesem Infektionstest als homogen (homozygot) tolerant erweisen, werden die oben beschriebenen Feldversuche durchgeführt.

In beiden Fällen gehen wir davon aus, dass uns im Frühjahr 2001 erstmalig tolerantes Ölkürbis-Zuchtmaterial zur Verfügung steht. Diese toleranten Linien können nach der Feldprüfung unter Umständen direkt als Sortenkandidaten betrachtet und für eine Registerprüfung angemeldet werden. Sie dienen auf jeden Fall als Basis für weitere Kreuzungs- oder Selektionsprogramme.

Markeranalyse

RAPD-Marker wurden für die Markierung des Resistenzgens gesucht. Molekulare Marker sind vom Phänotyp unabhängig, werden einfach vererbt und sind leicht nachweisbar. Sie zeigen das Vorhandensein eines rezessiven Resistenzallels bereits in einem sehr frühen Entwicklungszustand der Pflanze ohne Infektionsversuch an. Marker ersparen die künstlichen Infektionen und die Führung unnötigen Zuchtmaterials.

Für die Markersuche wurde die „Bulked segregant analysis“ verwendet (Michelmore et al. 1991, siehe Literatur im Manuskript). Aus der spaltenden F₂ der Kreuzungskombination toleranter Zucchini x österreichischer Ölkürbis wurden zwei DNA-Bulks (Pools, Ramsche) zusammengestellt, der eine Pool enthielt nur DNA von F₂-Pflanzen, deren Nachkommenschaften sich nach der phänotypischen Bonitur als einheitlich anfällig zeigten und daher homozygot für das Anfälligkeitsallel waren. Der zweite Pool sollte DNA von F₃-Pflanzen enthalten, deren Nachkommenschaft einheitlich Toleranz zeigte. Da solche Nachkommenschaften nicht gefunden wurden, haben wir DNA von toleranten F₂-Pflanzen verwendet, die aus Nachkommenschaften stammten, bei denen mehrere tolerante Pflanzen aufgetreten sind (z.B. solche mit der Boniturnote 1 oder 2 in den Nachkommenschaften der F₂-Pflanze 8 in Tabelle 1 im Manuskript). Insgesamt wurden 500 RAPD-Primer getestet, ohne dass ein Polymorphismus gefunden werden konnte (Abbildung 3). Die Trennung der Amplifikationsprodukte erfolgte in einem 10%-igen Polyacrylamidgel, welches im Vergleich zum Agarosegel die dreifache Anzahl von Banden sichtbar macht.

In einer ähnlichen, kürzlich veröffentlichten Studie haben Brown und Myers (2000 zitiert im Manuskript) über 1000 RAPD-Primer und 14 AFLP-Primerpaare verwendet, um einen DNA Marker zu finden, welcher verlässlich mit dem Toleranzgen aus Nigerian Local gekoppelt ist. Diese Untersuchung führte jedoch wie unsere zu keinem positiven Ergebnis.

Zweite Markeranalyse

Bei dieser zweiten Untersuchung, die ebenfalls nach der Methode der „bulk segregant analysis“ durchgeführt wird, verwenden wir die Selbstungsnachkommenschaft der zweiten Rückkreuzung, die bereits auf ihre Toleranz gegenüber dem Virus getestet wurde. Der tolerante Pool wurde aus toleranten Einzelpflanzen von BC2F2-Nachkommenschaften zusammengesetzt, in denen wir eine Spaltung für die Toleranz gefunden haben. Diese sollten theoretisch die gesuchten homozygot rezessiven (aa) Pflanzen sein. Sie zeigten nach der dritten Bonitur, etwa 5 Wochen nach der Infektion, immer noch nur sehr schwache Symptome. Es sind dies jene Pflanzen, die vom BFL ins IFA-Tulln überführt wurden und derzeit getestet werden. Sie enthalten einen theoretischen Anteil von 12,5% Zucchini Genmaterial, darunter das Toleranzgen. Der anfällige Pool wird aus Einzelpflanzen des anfälligen Elters (eine Zuchtlinie der Saatzucht Gleisdorf) zusammengesetzt, dieser enthält überhaupt kein Zucchini Genmaterial. Als Kontrolle wurde der tolerante Zuchnielter einbezogen. Bisher (Stand 12. Dezember 2000) wurden an diesen zwei Pools 236 RAPD-Primer getestet und dabei mehrere Polymorphismen gefunden (Abbildung 4), welche die Bande im toleranten Pool haben. Zunächst ist die Anwendung von 500 RAPD-Primern vorgesehen. Für die Überprüfung der gemeinsamen Spaltung (co-segregation) von Marker und Merkmal wird von 50 toleranten und 50 anfälligen BC2F3-Einzelpflanzen aus spaltenden bzw. nichtspaltenden BC2F2-Nachkommenschaften DNA isoliert und mit den gefundenen Markern getestet.