

Einführung weiterer Resistenzgene gegen das Zucchini-Gelbmosaikvirus (ZYMV) in den steirischen Ölkürbis mit klassischen und molekularen Selektionsmethoden

Forschungsprojekt Bund/Länder Kooperation

Projekt Nr. 1228 des BMLFUW

Projekt St D 42a der Steiermark

Beginn: September 05, 2001

Abschlussbericht

Oktober 2003

Projektleiter: *Prof. Dr. Tamas Lelley*
Abt. Biotechnologie in der Pflanzenproduktion
IFA-Tulln
Konrad Lorenz Str. 20
Tel.: 02272 66280-204
Fax: 02272 66280-203
E-mail: lelley@ifa-tulln.ac.at

Arbeitsgruppe Tamas Lelley
IFA Tulln
Projektmitarbeiter: Gertraud Stift und Martin Pachner

Für das letzte Projektjahr wurden folgende Arbeiten geplant (siehe auch Zwischenbericht vom Oktober 2002)

1 Nach Infektionstests und Markeranalyse, Erstellung der BC3F2- (im Winter) und der BC3F3-Generationen (im Frühjahr 2003) mit dem Gleisdorfer Zuchtmaterial. Ebenfalls nach Infektionstests und Markeranalyse, Erstellung der BC2F3-Generation (im Winter), Infektionstest und weitere Selbstung im Frühjahr:

Diese Arbeiten wurden planmäßig durchgeführt. Mit den zwei Linien S1 und S2 wurden, nach Kreuzung mit dem Resistenzträger True French Res., der ein dominantes Resistenzgen aus der *C. moschata* Landrasse „Menina 15“ 15“ aus Portugal enthält (im weiteren als M-Resistenz bezeichnet), insgesamt 21 BC3F3 und BC2F4 Nachkommenschaften erzeugt und an die Saatzucht Gleisdorf weitergegeben (Tabelle 1). Für die zur Selektion verwendeten molekularen Markern ist das gesamte Material als homozygot einzustufen. Für die BC3F3-Generation, die in diesem Herbst geerntet wurde, konnte ein Infektionstest naturgemäß noch nicht durchgeführt werden. Diese Untersuchungen werden bis Ende dieses Jahres abgeschlossen sein.

Damit ist das Hauptziel des Projektes, die Übertragung des dominanten Resistenzgens aus der Zucchiniorte True French Res. in zwei Linien der Saatzucht Gleisdorf, und die Auffindung von, mit der Resistenz gekoppelten, molekularen Markern (siehe Zwischenbericht) zur Unterstützung weiterer Selektionsarbeiten, voll erfüllt.

2 Zusammenführung der beiden Resistenzgene aus dem ersten und dem zweiten Projekt (Pyramiding) mittels Marker, erste Kreuzung im Winter, erste Selbstung im Frühjahr.

Die Ölkürbislinie 44/15 aus unserem ersten Projekt, welche die Resistenz aus der *C. moschata* Landrasse „Nigerian Lokal“ enthält (im weiteren als NL-Resistenz bezeichnet), wurde mit

einer toleranten Einzelpflanze aus der True-French Einkreuzung (siehe unter Punkt 1) mit M-Resistenz gekreuzt. Aus dieser Kreuzung wurden im Herbst 2003 drei F2-Populationen geerntet (Tabelle 2). Im weiteren wird in einem Infektionstest geprüft, ob eine phänotypische Unterscheidung der einfach- und doppelresistenten Genotypen möglich ist.

3 Resistenzprüfung von Kreuzungen verschiedener *C. moschata* Genotypen zur Untersuchung der Genetik der ZYMV-Resistenz in *C. moschata* im Winter bzw. im Frühjahr.

Diese Untersuchungen wurden weitergeführt (siehe auch Zwischenbericht), konnten jedoch bis jetzt noch nicht abgeschlossen werden, weil *C. moschata*, als eine für tropische Bedingungen angepasste Art, uns nicht ermöglicht, in unseren Breiten, mehr als eine Generation pro Jahr zu ziehen. Inzwischen sind alle für eine vollständige Analyse notwendigen Kreuzungen der 4 gewählten Genotypen erstellt worden, die erforderlichen Infektionsversuche werden im Winter 2003/04 durchgeführt. Die bereits jetzt vorliegenden Spaltungszahlen zwingen zu der Annahme, dass in drei resistenten und einem anfälligen Genotyp **unterschiedliche** Resistenzgene enthalten sind. Tabelle 3 gibt die Informationen zum derzeitigen Stand der Untersuchungen wieder. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Art *C. moschata* eine reichhaltige Quelle von Resistenzgenen für zukünftige Züchtungsarbeiten darstellt.

4 Neue Kreuzungen mit *C. moschata* („Bolina“ von H. Paris, Israel) im Winter und Rückkreuzungen im Frühjahr

Infektionsversuche haben gezeigt, dass die Ausprägung der Virusresistenz in der portugiesischen Landrasse „Bolina“ stark heterogen ist, noch mehr Heterogenität wurde an sonstigen morphologischen Eigenschaften, wie Blattmorphologie, Fruchtform, etc. beobachtet. Aus diesem Grunde wurde zunächst von Kreuzungen mit diesem *C. moschata* Genotyp Abstand genommen. Statt dessen wurden Selbstungen durchgeführt, um aus diesem Material für spätere Aufgaben zunächst Linien zu selektieren.

5 Fortführung des Moschatakreuzungsprogrammes

Die beiden Abbildungen 1 und 2 zeigen das inzwischen entstandene Material aus den *C. pepo* x *C. moschata* Kreuzungen. Aus diesem Material wurde im heurigen Frühjahr 30 verschiedene Nachkommenschaften an die Saatzucht Gleisdorf abgegeben, dort in Feldversuche gestellt und weiter geselbstet. Auch in unserem Zuchtgarten in Tulln, wurden einige vielversprechende Genotypen ausgepflanzt und geselbstet. Prüfungen von verschiedenen Rückkreuzungsgenerationen durch Infektionstests bestätigten die erfolgreiche Übertragung von weiteren Resistenzgenen aus *C. moschata* in den steirischen Ölkürbis.

6 Verifizierung der Kopplung zwischen den gefundenen molekularen Markern und der Resistenz gegen ZYMV im Zuchtmaterial

Leider konnte die im Zwischenbericht dargestellte Kopplung zwischen einem RAPD-Marker und der aus der Zucchiniorte „Tigress“ stammende NL-Resistenz in der resistenten Linie 44/15 (siehe auch Punkt 2), in weiteren Versuchen, nicht verifiziert werden. Eine neue, eigens für die Kopplungsanalyse erstellte Retzer Gold x Tigress Kreuzung überraschte uns mit der Beobachtung, dass der Marker nicht in allen F1 Pflanzen enthalten war. Folglich musste die Sorte „Tigress“ für den Marker heterogen gewesen sein. In darauf folgenden Infektionsversuchen erwies sich die Sorte „Tigress“ selbst für die Resistenz als heterogen. 5% der untersuchten Pflanzen waren anfällig. In der F2-Generation konnte zwischen Marker und Resistenz kein Zusammenhang mehr festgestellt werden. Ein Versuch mittels F2-Nachkommenschaften für eine erneute *bulked segregant analysis* homozygote resistente und anfällige F2-Pflanzen zu identifizieren, scheiterte. Vielmehr deuteten die erhaltenen Spaltungszahlen darauf hin, dass die NL-Resistenz in „Tigress“ durch zwei Gene kontrolliert wird. Das könnte erklären warum alle bisherigen Versuche, auch von anderen Arbeitsgruppen, einen gekoppelten molekularen Marker für diese Resistenz zu finden, erfolglos geblieben sind.

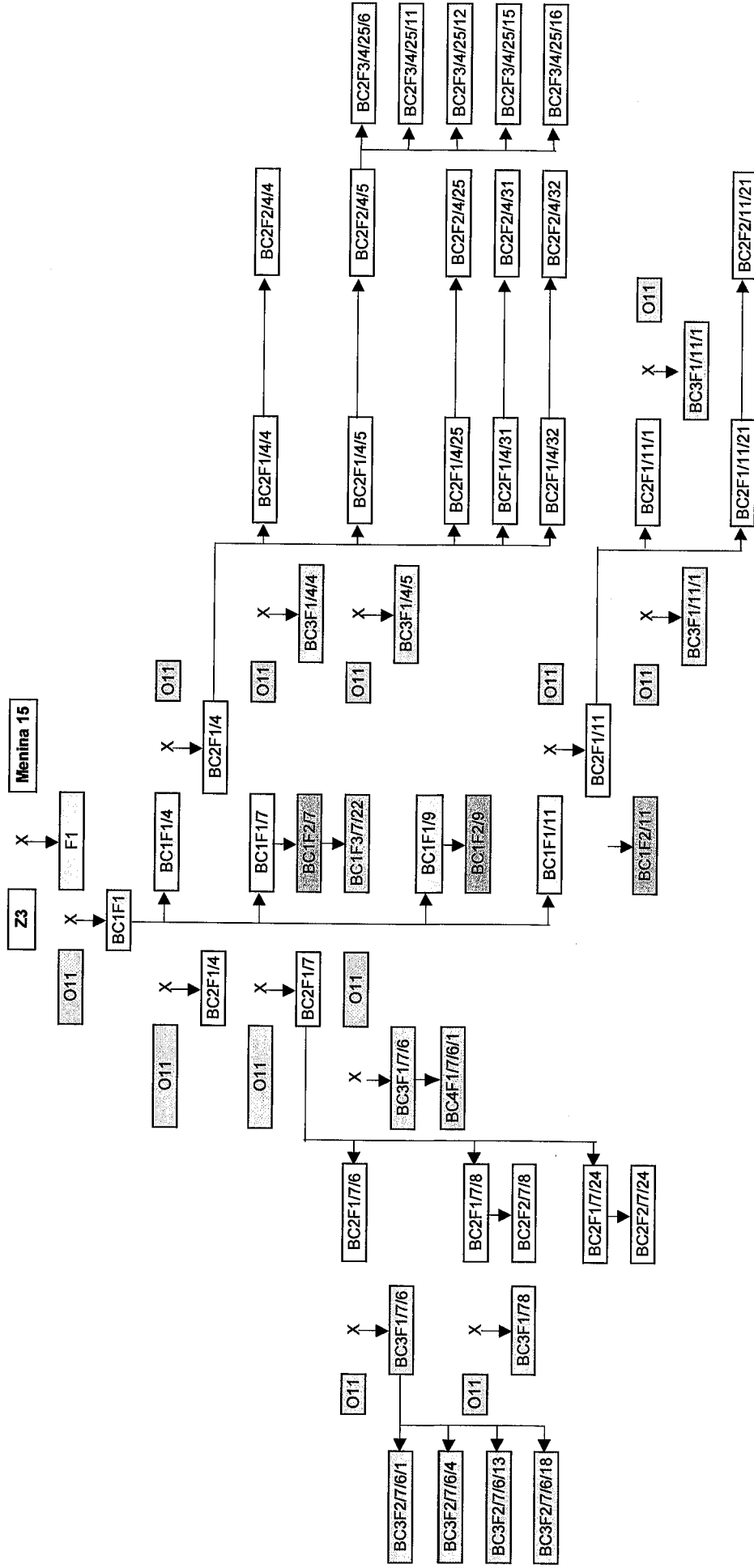
Im Gegensatz dazu verlief die Markersuche für die M-Resistenz in „True French Res.“ sehr erfolgreich. Aus 22 identifizierten Markerkandidaten haben sich als sehr gut geeignet für die Selektion. Die bisherigen Ergebnisse zeigen für den einen Marker eine Kopplung mit der M-Resistenz von 95% an, für einen zweiten Marker scheint diese Kopplung etwas geringer zu sein. Beide Marker werden von uns routinemäßig für die Selektion verwendet

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die gesetzten Ziele dieses Projektes weitestgehend erfüllt werden konnten. Es wurden zwei Resistenzgene (NL und M) in das bereitgestellte Zuchtmaterial der Saatzucht Gleisdorf übertragen und zumindest zu der M-Resistenz gelang es uns, funktionelle molekulare Marker zu entwickeln, die bereits in der praktischen Züchtung von der Saatzucht Gleisdorf verwendet werden. Die Nutzung von Markern spart der Saatzucht erhebliche Kosten, weil die teureren Infektionsversuche eingespart werden können und weil wesentlich weniger Pflanzen betreut werden müssen.

Es wurde mit der Zusammenführung der beiden Resistenzgene in einen Genotyp (Pyramiding) begonnen. Weiters ist uns gelungen durch direkte Kreuzungen mit *C. moschata* Genotypen neue genetische Variabilität inklusive neue Resistengene gegen ZYMV in das Zuchtmaterial der Saatzucht Gleisdorf einzuführen. Wir haben auch nachweisen können, dass in *C. moschate* mehrere verschiedene Resistenzgene gegen das Zucchini Gelbmosaikvirus enthalten sind, die für *C. pepo*, die bekanntlich keine solche Gene besitzt, genutzt werden können. Schließlich haben wir in einem gut isolierten Infektionsversuch die Wirksamkeit unserer Resistenzgene gegen vier verschiedene Virusisolate, darunter auch gegen das besonders aggressive Isolat aus Italien, getestet (siehe Tabelle 1 im Bericht M. Pfosser). Das Infektionsmaterial wurde uns von Dr. Martin Pfosser zur Verfügung gestellt. Die Auswertung dieses Versuches zeigte (Tabelle 4), dass die von uns verwendeten Resistenzgene, aber auch die, welche wir in *C. moschata* neu identifiziert haben, gegen die verwendeten Isolate guten Schutz bieten. Demnach ist es nicht zu befürchten, dass die eingeführten Resistenzen durch Veränderung des Virus bald überwunden werden könnten.

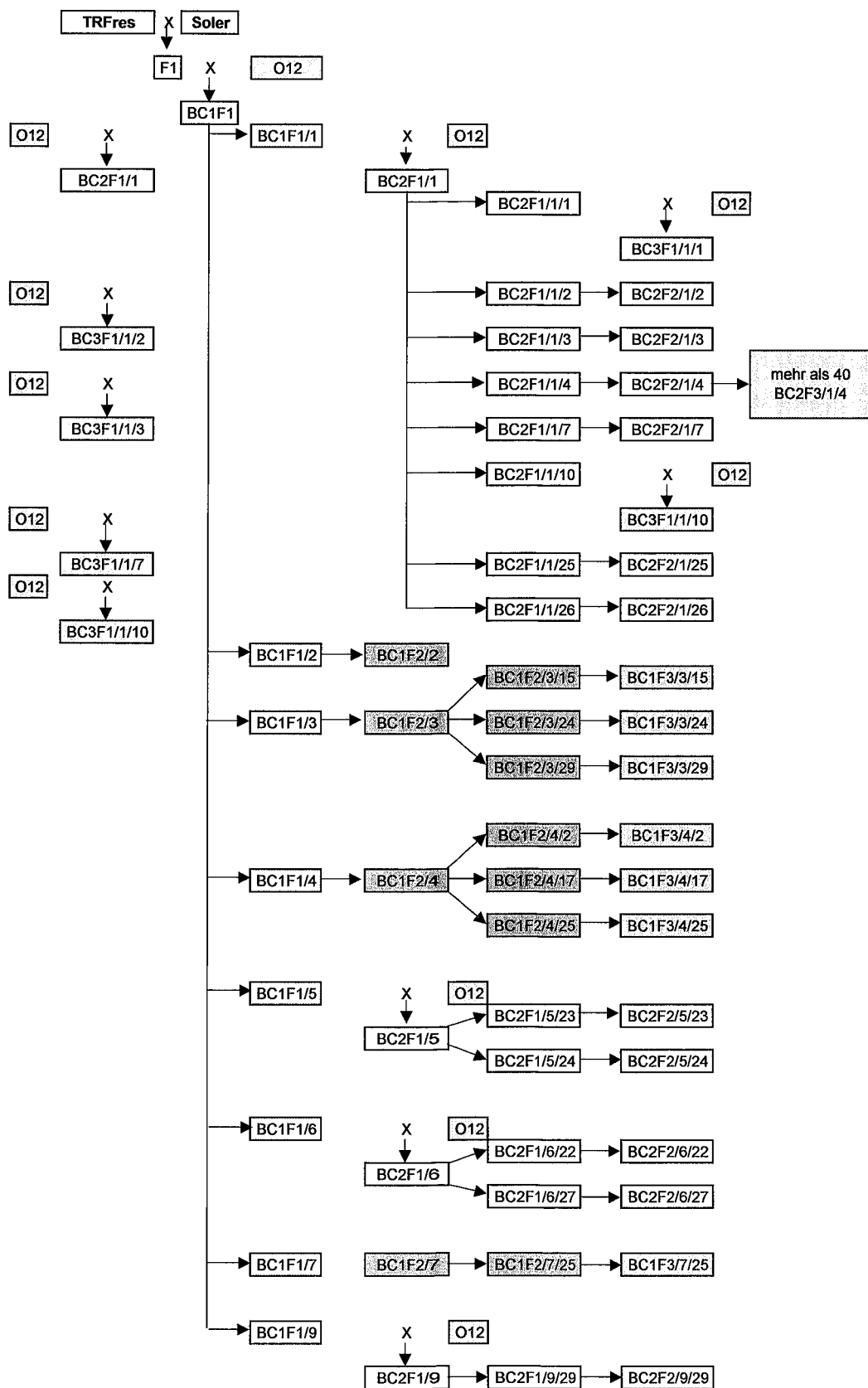
*

Abbildung 1: Einkreuzung von *C. moschata*, "Menina 15", in *C. pepo*



Z3... Zucchini "Diamant"
 O11... Ölkürbis Retzer Gold
 Die Farben differenzieren die verschiedenen Generationen

Abbildung 2: Einkreuzung von *C. moschata*, "Soler", in *C. pepo*



TRFres... True French resistant
 O12... Gleisdorfer Ölkürbis
 Die Farben differenzieren die verschiedenen Generationen

Tabelle 1: Material, welches zu Projektende der Saatzucht Gleisdorf zur Verfügung gestellt wurde

Generation	Frucht			Gesamt- Korngewicht g	Hundert- g	
	Farbe	Länge cm	DM cm			
S1BC2F4/32/3/2	S1	18	22	21,3	10,2	BC2F3 war sowohl im Infektionstest als auch mit Marker homozygot
S1BC2F4/32/3/3	S1	13	16	35,8	12,2	
S1BC2F4/32/3/4a	S1	13	19	47,0	12,1	
S1BC2F4/32/3/4b	S1	14	18	46,9	12,4	
S1BC2F4/32/3/4c	S1	16	21	47,0	12,9	
S1BC2F4/32/3/6	S1	18	23	20,4	12,4	
S1BC2F4/32/3/9	S1	18	23	39,5	11,6	
S1BC3F3/10/4/3a	S1	15	20	23,0	14,5	BC3F2 war mit Marker homozygot
S1BC3F3/10/4/3b	S1	15	22	19,3	13,9	
S1BC3F3/10/4/7a	S1	15	17	20,3	11,3	
S1BC3F3/10/4/7b	S1	15	17	28,9	12,0	
S1BC3F3/10/4/9	S1	14	23	8,74	14,6	
S2BC2F4/42/1/1	S2	16	21	66,9	13,6	BC2F3 war sowohl im Infektionstest als auch mit Marker homozygot
S2BC2F4/42/6/1a	S2	19	18	59,4	12,9	
S2BC2F4/42/6/1b	S2	17	20	74,3	11,5	
S2BC2F4/42/6/3a	S2	19	19	45,4	8,5	
S2BC2F4/42/6/3b	S2	21	20	36,9	7,9	
S2BC2F4/42/6/4	O12	22	20	54,2	14,2	
S2BC2F4/42/6/6a	S2	17	16	18,0	14,3	
S2BC2F4/42/6/6b	S2	18	16	51,5	15,9	
S2BC2F4/42/6/7a	S2	18	20	58,4	12,5	
S2BC2F4/42/6/7b	S2	17	19	61,7	12,1	
S2BC2F4/42/6/8	O12	20	19	31,1	18,3	
S2BC2F4/42/6/9a	O12	17	19	41,4	11,0	
S2BC2F4/42/6/9b	O12	18	19	47,5	13,5	
S2BC2F4/42/6/10	O12	19	16	21,5	16,2	
S2BC3F3/9/26/3a	S2	16	24	59,7	19,8	BC3F2 war mit Marker homozygot
S2BC3F3/9/26/3b	S2	17	23	52,6	14,4	
S2BC3F3/9/26/6a	S2	14	18	45,1	16,1	
S2BC3F3/9/26/6b	S2	17	23	38,6	16,4	
S2BC3F3/9/26/6c	S2	17	24	71,1	16,0	
S2BC3F3/9/32/7	S2	16	23	78,4	17,2	
S2BC3F3/9/32/10	S2	17	22	75,4	12,5	

Farbe: S1 ident mit Ausgangslinie SZG1
S2 ident mit Ausgangslinie SZG2
O12 eher wie Sorte Gleisdorfer Ölkürbis

Tabelle 2: Zusammenführung, Pyramiding, der NL- und M-Resistenz

Generation	Farbe	Frucht		Gesamt- Korngewicht g	Hundert- gewicht g
		Länge cm	DM cm		
44/15 x S2BC3F1/9/6 F2/2	O12	22	28	93,5	24,0
44/15 x S2BC3F1/9/6 F2/5a	O12	21	25	90,8	20,0
44/15 x S2BC3F1/9/6 F2/5b	O12	22	22	82,7	18,6
44/15 x S2BC3F1/9/6 F2/5c	O12	20	20	60,0	18,4
44/15 x S2BC3F1/9/6 F2/9a	O12	21	24	86,7	16,5
44/15 x S2BC3F1/9/6 F2/9b	O12	20	21	62,8	14,9
44/15 x S2BC3F1/9/6 F2/9c	O12	23	28	81,5	17,5

Die F1 Pflanzen
waren alle tolerant
(TRF-Marker und
Feldbeobachtung)

Farbe: O12 eher wie Sorte Gleisdorfer Ölkürbis

44/15 ... tolerante Ölkürbislinie aus der Tigress-Einkreuzung mit NL-Resistenz
S2BC3F1/9/6 ... tolerante Einzelpflanze aus der True French-Einkreuzung mit M-Resistenz

Tabelle 3: Ergebnisse eines Infektionsversuches zur Ermittlung des genetischen Hintergrundes der ZYMV-Resistenz in *C. moschata*. Die erhaltenen Spaltungszahlen deuten formal auf 4 Gene, die für die Resistenz bzw. Anfälligkeit verantwortlich sind. Die mit fettgedruckten Buchstaben bezeichneten Gene sind in den jeweiligen elterlichen Genotypen für die Resistenz zuständig.

	ges.	beob.		erwartet		p	Ratio	
		tol.	anf.	tol.	anf.			
F2 Sol x Men	211	170	41	171	40	0,80	13	3
(Sol x Men) x WB	108	57	51	54	54	0,56	1	1
F2 WB x Men	214	162	52	161	54	0,81	3	1
WB x (NL x Men)	106	91	15	93	13	0,61	7	1
F2 NI x Men	115	114	1	113	1,8	0,55	63	1

tol. = tolerant

anf. = anfällig

Menina (Men)	AA	bb	cc	DD
Nigerian Local (NL)	aa	BB	CC	DD
Soler (Sol)	aa	bb	cc	dd
Waltham Butternut (WB)	aa	bb	cc	DD

Tabelle 4: Ergebnisse eines Infektionsversuches mit verschiedenen Virusisolaten an einer repräsentativen Auswahl von Genotypen mit verschiedenen Resistenzgenen

Virus Isolat Sorte / Titer Blatt vom 1. - 8.	Watermelon		Zucchini Gelb Mosaik																																					
	Steiermark 140		Steiermark 100				Singapur 34				860				Italien 100																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8								
Tigress	0	1	1	1	2	2	1		0	2	1	1	2	2	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	2	2	3	3	3	3	0	1	1	2	2	3		
True French (resistent)	0	1	1	1	1	1	1		2	2	3	3	2	2	2		0	0	3	3	1	1	1	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2	2	3	4	3	2	1
True Fench (anfällig)	0	0	0	1	1	1	1		0	1	2	3	3	4	4		0	1	2	2	2	1	0		1	2	3	3	4	4	4	4	2	2	2	3	3	4	4	4
Ölkürbis (anfällig)	0	1	1	2	2	2	2		0	1	2	3	3	4		0	1	2	2	2	2	1		0	4	4	4	4	4	4	4	0	4	4	4	4	4	4	4	
Nigerian Local	0	1	0	1	1	1	1		0	1	1	1	1	1		0	0	0	0	0	0			0	2	2	1	0				0	1	1	1	1	0			
Menina 15	0	0	0	0	0	0	0		1	0	1	1	1	1		0	0	1	1	1	1			1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
Soler	0	0	0	1	0	0	0		0	1	2	2	2	2		0	1	2	1	1				1	2	2	2	0				1	2	2	2	0				

Boniturnoten 0-2... tolerant
3-5... anfällig

**BERICHT ZUM
BMLF FORSCHUNGSPROJEKT NR. 1228**

**EINFÜHRUNG WEITERER RESISTENZGENE GEGEN
DAS ZUCCHINI-GELBMOSAIKVIRUS (ZYMV) IN DEN
STEIRISCHEN ÖLKÜRBIS MIT KLASSISCHEN UND
MOLEKULAREN SELEKTIONSMETHODEN**

BERICHTSZEITRAUM: OKTOBER 2002 – OKTOBER 2003

ARBEITSGRUPPE M. PFOSSER

**HANNA BAUMANN
SONJA UNGAR
BERNHARD HOFINGER
MARIA MACHURA
MARTIN PFOSSER**

**INSTITUT FÜR BOTANIK
UNIVERSITÄT WIEN
RENNWEG 14
A-1030 WIEN
TEL. 0699-12895482
EMAIL: martin.pfossler@univie.ac.at**

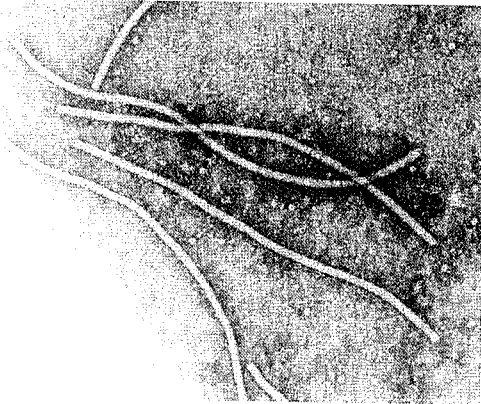


Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Potyvirus-Partikeln aus *Cucurbita pepo*.

1. Charakterisierung der in österreichischen Anbaugebieten an *Cucurbita pepo* vorkommenden Zucchini gelbmosaik-Stämmen (ZYMV).

Da die Phylogenie der in Österreich vorkommenden ZYMV-Stämme durch Sequenzvergleich mit ausländischen Isolaten aufgeklärt werden konnte (siehe diesbezügliche Veröffentlichungen) war der nächste Schritt der, die Virulenz der einzelnen Stämme im Infektionsversuch zu testen. Dazu wurden zunächst Reinkulturen folgender Isolate hergestellt (Tab. 1).

Tabelle 1: Untersuchte und reingezüchtete Isolate von ZYMV und WMV2

<i>Virusbezeichnung</i>	<i>ID</i>
ZYMV Isolat Austria 5	ZYMV-Austria-5
ZYMV Isolat Italy	PV-0416
ZYMV Isolat Singapore	PV-0382
Watermelon II (WMV2)	PV-0394

Reinkulturen von ZYMV wurden durch Inokulation von *Ranunculus sardous*-Pflanzen gewonnen, die nicht empfänglich für WMV2 sind. Durch zweimalige Subkultur auf neue Sämlinge von *Ranunculus sardous* konnte bei allen Isolaten 100%-ige Freiheit von WMV2 erzielt werden (PCR-Tests mit spezifischen WMV2-Primern waren negativ). Bevor die Isolate am Institut für Phytopathologie (AGES-Hirschstätten) in isolierten Klimakammern vermehrt wurden, wurde noch einmal die Reinheit der Isolate durch Sequenzieren überprüft (PFOSSER & BAUMANN 2002a, b). Bevor die Isolate zur Inokulation für den Infektionsversuch am IFA Tulln verwendet wurden, wurde erneut die Reinheit sowie immunologisch der Virustiter bestimmt um eine Vergleichsbasis für die Stärke der Infektion zu erhalten. Für Anlage und Auswertung des Infektionsversuches siehe Arbeitsgruppe LELLEY. Es konnte aber grundsätzlich bestätigt werden, dass die einzelnen Isolate entsprechend ihrer phylogenetischen Beziehungen in Gruppen unterschiedlicher Pathogenizität eingeteilt werden können.

PFOSSER, M. and H. BAUMANN (2002a). "Molecular characterization of zucchini yellow mosaic potyvirus (Potyviridae) strains isolated from diseased plants of Austrian oil pumpkin-growing areas." *Stapfia* **80**: 251-265.

PFOSSER, M. F. and H. BAUMANN (2002b). "Phylogeny and geographical differentiation of zucchini yellow mosaic virus isolates (Potyviridae) based on molecular analysis of the coat protein and part of the cytoplasmic inclusion protein genes." *Archives of Virology* **147**(8): 1599-1609.

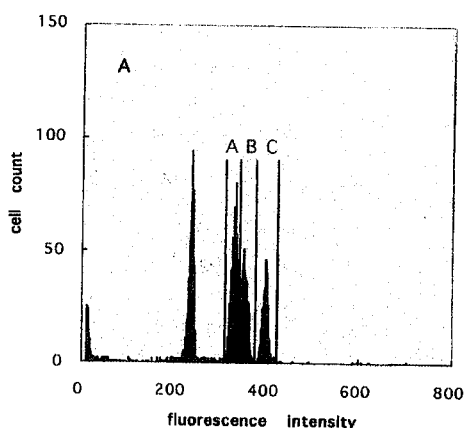


Abb. 2: Flow-Cytometrie Analyse einer Mischprobe aus verschiedenen Standards plus *C. pepo*.

2. Flow-cytometrische DNA-Gehaltsuntersuchungen an *Cucurbita* spp.

Die neu-weltliche Gattung *Cucurbita* umfasst ca. 20 Arten wobei 5 Arten nur in der Kulturform bekannt sind. Alle Arten besitzen 20 kleine Chromosomen. Aufgrund genetischer Untersuchungen sind die Genome der kultivierten Arten *C. pepo*, *C. maxima*, *C. mixta* und *C. moschata* relativ nahe verwandt, während *C. ficilolia* und die Wildart *C. foetidissima* entfernter verwandt sind. Dennoch ist die interspezifische Kreuzbarkeit nicht in allen Kombinationen gegeben. Wichtige Resistenzquellen gegenüber ZYMV existieren in verschiedenen Wildarten wie z. B. *C. ecuadorensis*, oder Kulturformen von *C. moschata*. Das Einkreuzen solcher Genotypen in *C. pepo* ist allerdings problematisch, da vielfach Kreuzungsbarrieren vorhanden sind, die die Anwendung aufwändiger Methoden wie *embryo rescue* oder anderer *in vitro* Methoden erfordern. Ein Grund für die fehlende interspezifische Kreuzbarkeit könnte in einer durch unterschiedliche Mengen an Heterochromatin im Zellkern hervorgerufenen Inkompatibilität der Genome liegen.

Zur Klärung dieser Frage wurde mit Hilfe der am Institut etablierten Flow-Cytometrie (PFOSSER *et al.*, 1995) untersucht, inwieweit sich der DNA-Gehalt der kultivierten Arten unterscheidet, bzw. auch, ob intraspezifische Unterschiede bei den einzelnen Genotypen bestehen. Bei allen untersuchten Genotypen lag der mittels Flow-Cytometrie (DAPI-Färbung) ermittelte DNA-Gehalt zwischen 1.04-1.12 pg (Tab. 2). Lediglich der Wert von *C. palmata* war mit 1.34 pg

abweichend. Unterschiedliche DNA-Gehalte bzw. Heterochromatinanteile spielen deshalb bei der Etablierung von Kreuzungsbarrieren möglicherweise keine entscheidende Rolle.

Tabelle 2: DNA-Gehaltsbestimmungen an verschiedenen Genotypen von *Cucurbita*.

Art/Genotyp	DNA-Gehalt in pg (2C)
<i>Brassica napus</i> (Standard)	2.41±0.12
<i>Cucurbita pepo</i> styriaca	1.04±0.08
<i>C. pepo</i> ovifera	1.08±0.11
<i>C. pepo</i> Tigress	1.03±0.12
<i>C. pepo</i> fraterna	1.04±0.10
<i>C. moschata</i>	1.12±0.09
<i>C. maxima</i>	1.10±0.11
<i>C. sororia</i>	1.04±0.10
<i>C. palmata</i>	1.34±0.18
<i>C. agryosperma</i>	1.09±0.12
<i>C. okeechobensis</i>	1.08±0.09
<i>C. ficifolia</i>	1.12±0.11
<i>C. andreana</i>	1.10±0.10

PFOSSER, M., AMON, A., LELLEY, T. and HEBERLE-BORS, E. (1995) Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry*, 21: 387-393.

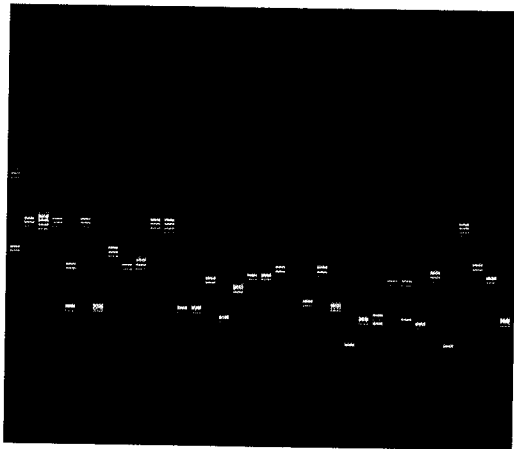


Abb. 3: Mikrosatelliten-Analyse an 31 Genotypen verschiedener *Cucurbita*-Arten.

3. Entwicklung von Mikrosatelliten-Markern für das Genom von *C. pepo*. bzw. für die Gattung *Cucurbita*.

Mikrosatelliten-Marker stellen eine Klasse von sehr robusten DNA-Markern dar und können deshalb leicht für Screening-Zwecke verwendet werden. In einer genetischen Karte stellen sie wertvolle Ankerpunkte zur chromosomalen Lokalisation von anderen Markertypen zur Verfügung. Zur Komplettierung der Markersuche wurden deshalb Mikrosatelliten-Marker entwickelt mit Hilfe derer es möglich ist, in der praktischen Züchtung Introgression von Merkmalen festzustellen bzw. in Kombination mit einem Mapping-Projekt chromosomale Lokalisation von Merkmalen zu verfolgen.

In Fortführung der Entwicklung von Mikrosatelliten-Markern wurden mittels der Sonden (GA)_n, (GGA)_n, (CA)_n, und (CCA)_n ein Panel von 37 Mikrosatelliten entwickelt, die an 27 Genotypen verschiedener *Cucurbita*-Arten (Tab. 3) auf Polymorphismen getestet wurden.

Dabei wurden sowohl Art-spezifische Mikrosatelliten (monomorph innerhalb einer Art) als auch Genotyp-spezifische (polymorph innerhalb einer Art) entdeckt (Tab. 4). Damit steht für die Kürbiszüchtung ein Mittel zur Verfügung, das es erlaubt, auf relativ einfachem Weg das Einkreuzen fremder Genotypen sowie die Verteilung elterlicher Gene in den verschiedenen Filialgenerationen zu verfolgen (Pfosser et al., submitted).

PFOSSER, M., HOFINGER B., and H. BAUMANN: A set of microatellite primers for detecting inter- and intraspecific variation in *Cucurbita*. Mol. Ecol. Notes (submitted).

Tabelle 3: *Cucurbita*-Genotypen zur Austestung der SSR-Marker

#	Plant	Variety
1	CU71	<i>C pepo</i> verrucos
2	CU07	<i>C pepo</i> styriaca
3	CU54	<i>C fraterna</i>
4	CY08	<i>C pepo</i> China dünnsch
5	CX01	<i>C pepo</i> Ebony
6	CU39	<i>C texana microcarpina</i>
7	CU10	<i>C pepo</i> oleifera
8	CU55	<i>C pepo</i> flogra
9	CU59	<i>C pepo</i> gumala
10	CY09	<i>C pepo</i> dickschalig
11	CY16	<i>C texana</i>
12	CX08	<i>C mixta</i> White Crookneck
13	CY21	<i>C pepo</i> ? ovifera
14	CU74	<i>C sp</i> Mexico
15	CX26	<i>C moschata</i> 'Skorsie'
16	CX18	<i>C moschata</i> Thai
17	CY14	<i>C moschata</i> Rostow
18	CU57	<i>C okeechobensis</i>
19	CU45	<i>C lundelliana</i>
20	CX20	<i>C ficifolia</i>
21	CX13	<i>C maxima</i> Rainbow
22	CX19	<i>C maxima</i> Nancy
23	CX17	<i>C maxima</i> Rouge
24	CY05	<i>C andreana</i>
25	CY22	<i>C maxima</i> N-Peru
26	CX21	<i>C foetidissima</i>
27	CU76	<i>C palmata</i>

Tabelle 4: Charakteristika der 37 Mikrosatelliten-Loci
In *Cucurbita* spp. (vergl. Tab. 3).

<i>Locus</i>	<i>Repeat motif</i>	<i># of alleles</i>
Cu033-1	GGGTTT	6
Cu033-2	GA	12
Cu032	GA	8
Cu031	GA	8
Cu033-3	CAA	9
Cu017-1	CAA	5
Cu014	GA	8
Cu015	GA	11
Cu007	GA	4
Cu114-1	GA	5
Cu114-2	repeat B	3
Cu203-1	CACAA	4
Cu203-2	CAA	6
Cu057-1	GAA	6
Cu057-2	GAA	5
Cu057-3	GAG	7
Cu204	GAA	7
Cu205	GGA	3
Cu206	GGA	6
Cu207	GGA	4
Cu208	CA	9
Cu209	CA	12
Cu066-1	CA	9
Cu066-2	CA	8
Cu067	CCA	4
Cu068	CCA	2
Cu070-1	CCCA	5
Cu070-2	repeat A	2
Cu070-3	CA	8
Cu077	repeat C	4
Cu078	CA	6
Cu079-1	CA	7
Cu079-2	CA	13
Cu212	GAA	6
Cu213	GAA	8
Cu214	GAA	7
Cu215	GAA	5

Einführung weitere Resistenzgene gegen das Zucchini-Gelbmosaikvirus (ZYMV) in den steirischen Ölkürbis mit klassischen und molekularen Selektionsmethoden. Projekt #1228

Lelley¹ T., Pachner¹ M., Stift¹ G., Winkler² J., and Pfosser³ M.

¹IFA-Tulln, Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Konrad Lorenz Str. 20, 3430 Tulln

²Saatzucht Gleisdorf Ges.m.b.H. Am Tieberhof 33, 8200 Gleisdorf

³Universität Wien, Institut für Botanik, Rennweg 14, 1030 Wien

Der katastrophale Viruseinbruch im Jahr 1997 hat gezeigt, dass die österreichischen Ölkürbissorten (*Cucurbita pepo* L.) keinen genetisch bedingten Schutz gegen das Zucchini Gelbmosaikvirus (ZYMV) haben und die Entwicklung solcher Sorten ist dringend notwendig. Als Konsequenz wurde 1998, im Rahmen einer Bund/Länder Kooperation, das „**Kürbisprojekt**“ ins Leben gerufen. Im Jahre 2001 wurde dieses Projekt mit dem Folgeprojekt Nr. 1228 um weitere zwei Jahre fortgesetzt.

Genetisch bedingte Virustoleranz wurde bisher in der Art *C. pepo* nicht gefunden. Es wurden jedoch mindestens zwei Toleranzgene durch **Artkreuzungen** aus *C. moschata* in Zucchiniarten von *C. pepo* übertragen. Nach der Einführung eines solchen Gens aus der Sorte 'Tigress', ursprünglich aus der nigerianischen Landrasse 'Nigerian Local' (NL-Resistenz) im ersten Projekt, erhielten wir ein zweites Resistenzgen, welches wir durch ein Rückkreuzungsprogramm in zwei Zuchtlinien der Saatzeit Gleisdorf übertrugen. Diese Resistenz stammte aus der portugiesischen *C. moschata* Landrasse 'Menina' (M-Resistenz). Während die NL-Resistenz sich rezessiv verhält ist die M-Resistenz dominant ausgeprägt. Das entstandene Zuchtmaterial ist bereits der Saatzeit Gleisdorf übergeben worden.

Gleichzeitig suchten wir **molekulare Marker**, die mit der Toleranz eng gekoppelt sind. Molekulare Marker sind leicht nachweisbare Polymorphismen der DNA. Sie helfen bei der Selektion, indem sie durch ihre enge Kopplung mit dem Toleranzgen deren Anwesenheit anzeigen. Man erspart sich teure Infektionsversuche und braucht weniger Pflanzenmaterial. Unsere Suche nach solch einem Marker für die NL-Resistenz blieb erfolglos. Wir fanden jedoch mehrere gute Marker für die M-Resistenz, die bereits in der praktischen Züchtung eingesetzt werden.

Ein weltweiter Vergleich verschiedener ZYMV-Isolate hat gezeigt, dass die österreichischen Isolate am nächsten mit den Isolaten aus Ungarn und Slovenien verwandt sind, während die Isolate aus den benachbarten Ländern Italien und Deutschland unterschiedlichen genetischen Gruppen angehören. Für einen dauerhaften Schutz gegen Virusinfektion erscheint es deshalb unumgänglich, die Resistenzzüchtung auf eine möglichst breite Basis mit Einkreuzung so vieler Resistenzgene wie möglich zu stellen.

Molekulare Marker ermöglichen zudem die Zusammenführung (**Pyramiding**) verschiedener Resistenzgene in einen Genotyp. Damit verringert sich die Gefahr, dass das Virus die Resistenzbarriere schnell durchbricht. Wir haben die Kreuzung und Selbstung zwischen zwei Linien, die im Laufe dieses Projektes entstanden sind und zwei unterschiedliche Resistenzgene enthalten,

durchgeführt. Im Winter 2003/04 werden mit diesem Material die ersten Infektionsversuche gemacht. Wir hoffen, die Anwesenheit der NL-Resistenz, für die wir keinen Marker fanden, durch die spezifische phenotypische Reaktion der Pflanzen auf die Infektion zu identifizieren.

Durch die Analyse von Kreuzungsnachkommenschaften zwischen *C. moschata* Genotypen fanden wir, dass die Art *C. moschata* noch weitere Resistenzgene gegen ZYMV besitzt. Durch Kreuzungen zwischen *C. moschata* und *C. pepo*, gelang es uns solche Resistenzgene in das Gleisdorfer Zuchtmaterial zu übertragen.

In einem umfangreichen Infektionstest haben wir schließlich die eingekreuzten, aber auch die in *C. moschata* neu identifizierten Toleranzgene auf ihre Effizienz gegen vier verschiedene geographische Virusisolate, darunter ein Wassermelonen Mosaikvirus und ein besonders aggressives ZYMV-Isolat aus Italien, geprüft. Die getesteten Resistenzgene haben gegen alle diese Virusisolate gute Toleranz gezeigt. Demnach dürften die von uns verwendeten Resistenzgene gegen ein breites Spektrum von diversen Virusisolaten Schutz bieten. Eine baldige Überwindung dieser Resistenz - durch eine Neuanpassung des Virus - ist nicht zu erwarten.

**Introduction of further resistance genes against Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) in
Styrian oil pumpkin using classical and molecular selection methods**

Project No. 1228

Lelley¹ T., Pachner¹ M., Stiff¹ G., Winkler² J., and Pfosser³ M.

¹IFA-Tulln, Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Konrad Lorenz Str. 20, 3430 Tulln

²Saatzucht Gleisdorf Ges.m.b.H. Am Tieberhof 33, 8200 Gleisdorf

³Universität Wien, Institut für Botanik, Rennweg 14, 1030 Wien

The severe virus epidemic in 1997 has shown, that Austrian oil-pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) varieties have no genetically determined protection against Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV). The rapid development of such varieties became absolutely necessary. As a consequence in 1998, in cooperation between the federal government and the governments of the provinces Styria, Lower Austria and Burgenland, the „Pumpkin Project“ was established. In 2001 this project was extended with the project No. 1228, for another two years.

Genetically controlled resistance was not yet found in *C. pepo*, but at least two resistance genes were transferred from *C. moschata*, another cultivated *Cucurbita* species, also known as tropical pumpkin, into various zucchini genotypes. In the first three years of the project we transferred a recessive tolerance gene from the zucchini variety ‘Tigress’, to oil-pumpkin. This tolerance gene originated from the Nigerian *C. moschata* landrace ‘Nigerian Local’ (NL-resistance). In the last two years we transferred a second, dominantly inherited, resistance gene, from another zucchini genotype. This gene originated from a Portuguese *C. moschata* landrace ‘Menina’ (M-resistance). Through a back-cross program, this second resistance gene was also transferred into two advanced breeding lines of Saatzucht Gleisdorf. The obtained lines have already been handed over to the Saatzucht Gleisdorf.

Parallel to the breeding program we started to develop molecular markers linked to the resistance genes. Such markers represent DNA polymorphisms which are easy to identify. They help to select the gene without artificial infection and reduce the number of plants to be handled. While, unfortunately, we found no such marker for the NL-resistance, very good markers could be detected for the M-resistance. These markers are already in use in the selection program of Saatzucht Gleisdorf.

A worldwide comparison of ZYMV strains has shown that the Austrian isolate is most closely related to isolates from Hungary and Slovenia. Isolates from adjacent countries like Germany and Italy belong to genetically different groups of ZYMV strains. Therefore, it is advisable to put the resistance against ZYMV infection on a broad genetic basis including as many resistance genes as possible.

Molecular markers make it possible to unite different resistance genes in one genotype (**Pyramiding**). Thereby, the virus has to overcome a higher barrier to infect the plants. We started to join the two genes introduced previously into the breeding material of Gleisdorf. The first infection experiments with selfed F2 progenies will be carried out in this winter. We hope to be able to identify the presence

of NL-resistance, for which we did not find a marker, by the specific phenological response of the plants to the virus.

Crossings and progeny testings for resistance of different *C. moschata* genotypes revealed further resistance genes against ZYMV in the species. Meanwhile, we have some of them already transferred to breeding material of Saatzucht Gleisdorf.

Finally, a large scale infection experiment was carried out, using all presently available resistance genes in *C. moschata* including those already transferred in breeding material of Saatzucht Gleisdorf and three different geographic isolates of ZYMV and a Watermelon virus isolate. One of the geographic isolates of ZYMV represents a specifically aggressive isolate from Italy. All studied resistance genes showed good tolerance against all different virus races, suggesting, that the resistance we have introduced into the Styrian oil-pumpkin breeding material, can be expected to be durable, and will not be overcome soon by new adaptation of the virus.

Einführung weiterer Resistenzgene gegen das Zucchini-Gelbmosaikvirus (ZYMV) in den steirischen Ölkürbis mit klassischen und molekularen Selektionsmethoden

Lelley¹ T., Pachner¹ M., Stift¹ G., Winkler² J., und Pfosser³ M.

¹IFA-Tulln, Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Konrad Lorenz Str. 20, 3430 Tulln

²Saatzucht Gleisdorf Ges.m.b.H. Am Tieberhof 33, 8200 Gleisdorf

³Universität Wien, Institut für Botanik, Rennweg 14, 1030 Wien

Der katastrophale Viruseinbruch im Jahr 1997 hat gezeigt, dass die österreichischen Ölkürbissorten (*Cucurbita pepo* L.) keinen genetisch bedingten Schutz gegen das Zucchini Gelbmosaikvirus (ZYMV) besitzen und deshalb ein dringender züchterischer Handlungsbedarf besteht (Abb. 1). Als Konsequenz wurde im Jahre 1998, im Rahmen einer Bund/Länder Kooperation, das **Kürbisprojekt** ins Leben gerufen. Im Jahre 2001 wurde dieses Projekt mit einem Folgeprojekt Nr. 1228, mit dem obigen Titel fortgesetzt.



Abb. 1: ZYMV infiziertes Blatt von *C. pepo*. Das Blatt ist stark gelappt und zeigt neben der hellgrünen Farbe dunkelgrüne Bläschen auf der Blattoberfläche

Genetisch bedingte Virustoleranz wurde bisher in der Art *C. pepo* nicht gefunden. Es wurden jedoch mindestens zwei Toleranzgene durch **Artkreuzungen** aus *C. moschata* in Zucchiniarten von *C. pepo* übertragen. Nach der Einführung eines solchen Gens aus der Zuchinisorte 'Tigress', im ersten Projekt, welches ursprünglich aus der nigerianischen Landrasse 'Nigerian Local' (NL-Resistenz) stammt, erhielten wir ein zweites Resistenzgen

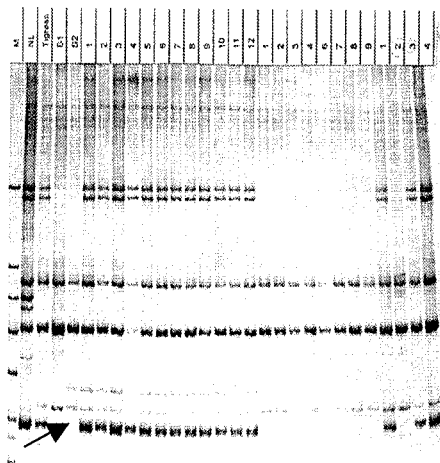


Abb. 2: Ein molekularer Marker (Pfeil), eine Bande im Elektrophorogramm, zeigt die Anwesenheit des gewünschten Gens an. Die Pflanzen, welche diese nicht haben, sind anfällig. In jeder Bahn, von oben nach unten, sind DNA-Fragmente einer Einzelpflanze.

von einem israelischen Kollegen. Diese Resistenz wurde aus der portugiesischen Landrasse 'Menina' (M-Resistenz) in Zucchini eingekreuzt. Während die NL-Resistenz sich rezessiv verhält ist die M-Resistenz dominant ausgeprägt. Durch ein Rückkreuzungsprogramm ist es uns gelungen, dieses zweite Gen in zwei Zuchtlinien der Saatzeit Gleisdorf zu übertragen. Das entstandene Zuchtmaterial ist bereits der Saatzeit Gleisdorf übergeben worden.

Parallel zum Rückkreuzungsprogramm suchten wir **molekulare Marker**, die sich in der Nähe des Resistenzgens befinden und mit der Toleranz möglichst eng gekoppelt sind. Molekulare Marker sind

Polymorphismen auf DNA-Ebene, die leicht nachzuweisen sind. Sie helfen bei der Selektionsarbeit, indem sie die Anwesenheit des gewünschten Toleranzgens anzeigen. Man erspart sich teure Infektionsversuche und kommt mit wesentlich weniger Pflanzenmaterial aus. Wir haben solche Marker gefunden, sie werden bereits in der praktischen Züchtung eingesetzt. Dazu wird eine kleine Blattprobe von dem ersten Laubblatt einer Pflanze entnommen. Aus diesem Blatt wird DNA extrahiert und die Anwesenheit des Markers nach einer PCR Reaktion in einem Elektrophoresegele geprüft (Abb. 2).

Ein weltweiter Vergleich von ZYMV-Isolaten hat gezeigt, dass die österreichischen Isolate am nächsten mit den Isolaten aus Ungarn und Slovenien verwandt sind, während die Isolate aus den benachbarten Ländern Italien und Deutschland unterschiedlichen genetischen Gruppen angehören (Abb. 3). Für einen dauerhaften Schutz gegen Virusinfektion erscheint es deshalb unumgänglich, die Resistenzzüchtung auf eine möglichst breite Basis mit Einkreuzung so vieler Resistenzgene wie möglich zu stellen.

Molekulare Marker ermöglichen die Zusammenführung verschiedener Resistenzgene in einen Genotyp (**Pyramiding**). Damit verringert sich die Gefahr, dass das Virus die Resistenzbarriere schnell durchbricht. Wir haben die Kreuzung und Selbstung zwischen zwei Linien, die im Laufe dieses Projektes entstanden sind und zwei unterschiedliche Resistenzgene enthalten, durchgeführt. Im Winter 2003/04 werden die ersten Infektionsversuche gemacht.

Zur Komplettierung der Markersuche wurden zusätzlich zu RAPD und AFLP-Markern auch Mikrosatelliten-Marker entwickelt, mit Hilfe derer es möglich ist, in der praktischen Züchtung Introgression von Merkmalen festzustellen bzw. in Kombination mit einem Mapping-Projekt chromosomale Lokalisation von Merkmalen zu verfolgen. Mit Hilfe von vier Mikrosatellitensonden wurden 37 Mikrosatelliten entwickelt, die an 27 Genotypen verschiedener *Cucurbita*-Arten auf Polymorphismen getestet wurden.

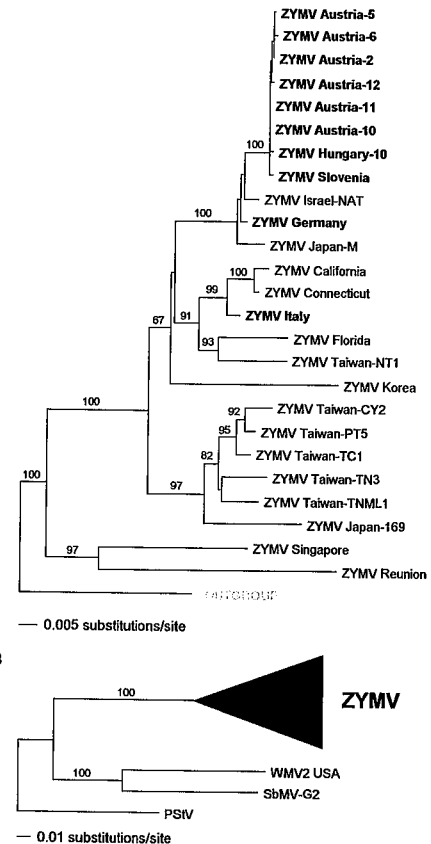


Abb. 3: Phylogenetische Analyse der in Österreich vorkommenden ZYMV-Stämme. A: verwandtschaftliche Beziehungen zwischen geographisch differenzierten ZYMV-Stämmen. B: verwandtschaftliche Beziehung von ZYMV zu anderen Potyviren.

Dabei wurden sowohl Art-spezifische Mikrosatelliten (monomorph innerhalb einer Art) als auch Genotyp-spezifische (polymorph innerhalb einer Art) entdeckt. Damit steht für die Kürbiszüchtung ein Mittel zur Verfügung, das es erlaubt, auf relativ einfachem Weg das Einkreuzen fremder Genotypen sowie die Verteilung elterlicher Gene in den verschiedenen Filialgenerationen zu verfolgen (Abb. 4).

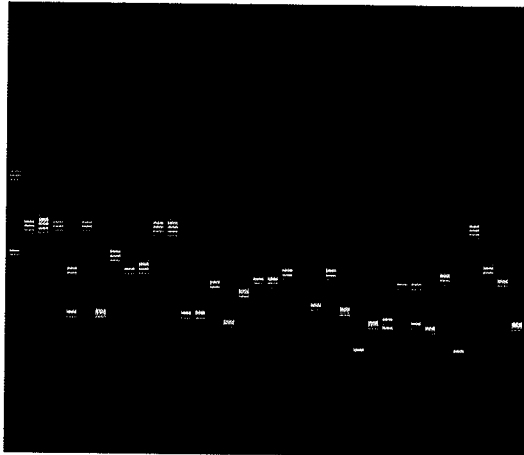


Abb. 4: Mikrosatelliten-Analyse an 31 Genotypen (incl. 5 Tochterpflanzen-Analysen) verschiedener *Cucurbita*-Arten

Durch die Analyse von diversen *C. moschata* Kreuzungsnachkommenschaften konnten wir zeigen, dass in der Art *C. moschata* weitere Resistenzgene gegen ZYMV enthalten sind. Es ist uns gelungen, durch Kreuzungen zwischen *C. moschata* und *C. pepo*, solche Resistenzgene in das

Gleisdorfer Zuchtmaterial zu übertragen. Die gleichzeitig entstandene große genetische Variabilität kann züchterisch genutzt werden. Im Jahr 2003 wurde dieses Material erstmalig unter Feldbedingungen von der Saatzucht Gleisdorf getestet.

Wir haben in einem Infektionstest die bereits eingekreuzten, aber auch die in *C. moschata* gefundenen Toleranzgene auf ihre Effizienz gegen vier verschiedene Virusstämme, darunter ein Wassermelonen Mosaikvirus und einen besonders aggressiven ZYMV Stamm aus Italien, geprüft. Die geprüften Resistenzgene haben gegen alle diese Virusstämme gute Toleranz gezeigt. Aus diesem Ergebnis schließen wir, dass die von uns verwendeten Resistenzgene gegen ein breites Spektrum von diversen Virusisolaten Schutz bieten, und mit einer baldigen Überwindung dieser Resistenz - durch eine Neuanpassung des Virus - nicht zu rechnen ist (Abb. 5).



Abb. 5: Virusfreier Ölkürbis vor der Ernte