



Pflanzenzüchtung für den Biolandbau – Resistenz gegen Zwergsteinbrand

Forschungsprojekt Nr. 100898
COBRA-Austria

Der österreichische Projektteil wird im Rahmen des europäischen ERA-Net-Projekts Core Organic II vom Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft finanziell gefördert.

Univ. Prof. Hermann Bürstmayr & Mag. Almuth Müllner

Universität für Bodenkultur Wien
Department IFA Tulln
Biotechnologie in der Pflanzenproduktion
Konrad Lorenz Straße 20
A-3430 Tulln
Telefon: 0043 2272 66280 201
Email: hermann.buerstmayr@boku.ac.at
Web: <http://www.ifa-tulln.boku.ac.at/615.html>

Tulln, Oktober 2016

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	4
2. PROJEKTDESCHEIBUNG	6
3. MATERIAL UND METHODEN	8
3.1 Pflanzenmaterial	8
3.2 Feldversuche	8
3.3 Statistische Auswertung der Daten	9
4. ERGEBNISSE.....	12
4.1 Erschließung neuer Resistenzquellen.....	12
4.2 Genetische Kartierung von Resistenzgenen	12
4.2.1 Erstellen von Kartierungspopulationen	12
4.2.2 Resistenzprüfungen.....	13
a. Ergebnisse Resistenzprüfungen für Kartierungspopulationen.....	14
b. Ergebnisse Resistenzprüfung für Elternlinien und Differentialsortiment	20
4.2.3 Auswahl von Kartierungspopulationen.....	22
4.2.4 Genotypisieren von drei Kartierungspopulationen	22
4.2.5 Statistische Auswertung der Phänotyp und Genotyp Daten	22
a. Blizzard.....	22
b. Bonneville.....	23
c. PI119333	23
4.3 Identifizierung von molekularen Markern	24
4.4 Bereitstellung von resistenten Zuchtlinien.....	26
4.5 Weitere Tätigkeiten	26
5. ZUSAMMENFASSUNG	27
Literatur	28

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht Arbeitspakete und Arbeitsschritte 2013 bis 2016.....	7
Tabelle 2 Übersicht COBRA Partner	7
Tabelle 3 Übersicht Kartierungspopulationen 2014 bis 2016.....	8
Tabelle 4 COBRA Austria Versuchsstandorte und Versuchsbedingungen 2014 bis 2016	10
Tabelle 5 COBRA Partner Versuchsstandorte und Versuchsbedingungen 2014 bis 2016.....	11
Tabelle 6 Übersicht über die COBRA Austria Kartierungspopulationen und erfolgreich erhobenen Versuchsdaten.....	14
Tabelle 7 Überblick über die Ergebnisse der Resistenzprüfungen 2014 bis 2016.....	16
Tabelle 8 Häufigkeitsverteilung und Anzahl von resistenten und anfälligen Linien für die Populationen	17

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Häufigkeitsverteilung von resistenten und anfälligen Linien in Steinbrand Resistenztest.....	18
Abbildung 2 Häufigkeitsverteilung und Anzahl von resistenten und anfälligen in Zwergsteinbrand Resistenztests	19
Abbildung 3 Ergebnisse Resistenzprüfungen für Elternlinien	21
Abbildung 4 Ergebnisse Resistenzprüfungen für Differentialsortiment.....	21
Abbildung 5 Marker Effekt auf den Krankheitsbefall in den Populationen	25

1. EINLEITUNG

Entsprechend ökologischer Richtlinien (EU Bio Verordnungen 834/2007 und 889/2008) darf Saatgut im Biolandbau nicht gebeizt werden. Deswegen sind Sorten, welche Resistenz gegenüber samen- und bodenbürtigen Pilzkrankheiten wie gewöhnlichem Steinbrand (verursacht durch *Tilletia caries* und *Tilletia foetida*) und Zwergsteinbrand (verursacht durch *Tilletia controversa*) aufweisen, von besonderem Interesse. Zwergsteinbrand stellt eine besondere Herausforderung für den Biolandbau dar, da er – anders als der gewöhnliche Steinbrand – bodenbürtig ist und somit nicht mittels Saatguthygiene bekämpft werden kann. Aufgrund fehlender pflanzenbaulicher Bekämpfungsmöglichkeiten bleibt Landwirten auf verseuchten Bio Flächen oftmals einzig die Option, auf Winterweizen Anbau ganz zu verzichten. Erkenntnisse der letzten Jahre lieferten Hinweise, dass auch für Steinbrand – von dem angenommen wurde, dass die Infektion ausschließlich über das Saatgut selbst erfolgt – eine Infektion über den Boden möglich ist (siehe AGES Forschungsprojekt „CARIES - Forschungsprojekt zu Gewöhnlichem Steinbrand in Österreich“). Der Frage der Sortenresistenz in Winterweizen gegenüber beiden Krankheiten – Steinbrand und Zwergsteinbrand – kommt daher eine große Bedeutung zu.

Die Genetik der Steinbrand Resistenz ist wenig erforscht. Phänotypisch wurden für Weizen 14 Differentialsorten identifiziert, welche jeweils eines der postulierten Gene *Bt1* bis *Bt13* und *BtP* tragen, die rassenspezifische (mongogenische) Resistenz gegenüber Steinbrand bzw. Zwergsteinbrand vermitteln (Hoffmann & Metzger 1976; Metzger & Hoffmann 1978; Goates 1996). Nur 6 dieser *Bt* Gene (*Bt1*, *Bt4*, *Bt5*, *Bt6*, *Bt7* und *Bt10*) konnten bis dato spezifischen Weizen Chromosomen zugeordnet und somit grob kartiert werden (Zusammenfassung in Matanguihan & Murphy 2011). Der Anbau des Differentialsortiments im Rahmen von Feldversuchen lässt Rückschlüsse auf das lokal vorhandene Rassenspektrum zu bzw. erlaubt zu bestimmen, welche der *Bt* Resistenzgene lokal wirksam sind. Des Weiteren konnten verschiedene QTL (Quantitative Trait Loci) in Weizen identifiziert werden, welche unvollständige aber rassenspezifische (polygenische) Resistenz gegenüber Steinbrand und Zwergsteinbrand vermitteln (Fofana et al. 2007; Wang et al. 2009; Dumalasová et al. 2012; Singh et al. 2016; Chen et al. 2016). Einzig für das Resistenzgen *Bt10* stehen zum jetzigen Zeitpunkt molekulare Marker zur Verfügung stehen, welche in der Praxis Verwendung finden können, um resistente Pflanzen welche *Bt10* tragen, zu identifizieren (Laroche et al. 2000).

Zur Wirksamkeit von *Bt* Genen in Österreich, und somit auch das Rassenspektrum von Steinbrand und Zwergsteinbrand betreffend, wurde bisher nur eine Untersuchung veröffentlicht (Huber & Buerstmayr 2006). Gegen Steinbrand wirksame Resistenz Gene in Österreich waren demnach *Bt4*, *Bt5*, *Bt6*, *Bt8*, *Bt9*, *Bt10*, *Bt11*, *Bt12* und *BtP*. Nur ein Teil des Differentialsortiments wurde im Rahmen dieser Untersuchung auch auf Resistenz gegenüber Zwergsteinbrand getestet (*Bt8*, *Bt9*, *Bt10*, *Bt12*, *Bt13*, *BtP*): Besonders interessant war, dass in dieser Untersuchung die gegen Steinbrand wirksamen *Bt* Gene *Bt8*, *Bt9* und *Bt10* keine Resistenz gegenüber Zwergsteinbrand vermitteln konnten. Zieht man auch die Ergebnisse unseres Projektes in Betracht, kann man zum jetzigen Zeitpunkt davon ausgehen, dass von den beschriebenen *Bt* Genen

einzig *Bt11* und *Bt12* stabile und ortsübergreifende Resistenz gegen beide Brand-Krankheiten vermitteln.

Züchtungsbemühungen betreffend Steinbrand und Zwergsteinbrand resistenter Weizensorten sind mit dem Aufkommen von wirkungsvollen Beizmitteln in den 1950er Jahren in den Kinderschuhen steckengeblieben. Die klassische ausschließlich feldbasierte (phänotypische) Resistenzzüchtung für beide Krankheiten ist sehr zeit- und kostenintensiv und diese zusätzlichen Aufwände können von den Züchtern in der Regel nicht gerechtfertigt werden. Im Gegensatz zur phänotypischen Selektion am Feld kann die genotypische Selektion mittels molekularer Marker relativ einfach in ein Zuchtprogramm integriert, und geeignetes Zuchtmaterial rasch und günstig bereits in frühen Generationen identifiziert werden. Voraussetzung für die Anwendung molekularer Markertechnologie in der Sortenentwicklung ist die Identifizierung von verlässlichen Markern: dies benötigt jedoch einen beträchtlichen wissenschaftlichen und finanziellen Aufwand.

Das Projekt „Pflanzenzüchtung für den Biolandbau – Resistenz gegen Zwergsteinbrand“ hatte zum Ziel, Abschnitte im Weizengenom, welche solide Resistenz gegen Steinbrand und Zwergsteinbrand vermitteln, zu kartieren und molekulare Marker für diese zu identifizieren. Molekulare Marker werden die Selektion von regional angepassten Sorten mit optimaler Steinbrand und Zwergsteinbrand Resistenz ermöglichen. Solche Sorten sind für den biologischen Weizenanbau in Österreich dringend erforderlich, da durchwegs alle Winterweizen Sorten, von denen derzeit Saatgut in Bioqualität angeboten wird, hoch anfällig sind.

2. PROJEKTBE SCHREIBUNG

Das vorliegende Projekt sollte einen Beitrag zur Verminderung der jährlich durch Zwergsteinbrand und Steinbrand verursachten Schäden für Österreichs Landwirtschaft leisten. Im Zuge der Projektentwicklung – und in Ergänzung zum ursprünglichen Vorhaben ausschließlich Zwergsteinbrand Resistenz zu untersuchen – wurde entschieden, die Resistenzquellen und Kartierungspopulationen auch auf Resistenz gegenüber Steinbrand zu testen, um zusätzliches Wissen betreffend der Interaktion dieser beiden Krankheiten zu erlangen, und nicht zuletzt auch, um molekulare Marker zu identifizieren, welche in der Resistenzzüchtung für beide Krankheiten verwendet werden können. Dies war besonders in Anbetracht neuerer Erkenntnisse der AGES, dass Steinbrandinfektion auch über den Boden möglich ist, ein sehr wichtiger Schritt.

Das vorliegende Projekt hatte die Bewerkstelligung folgender Arbeitspakete zur Aufgabe:

1. Erschließung von neuen, wirksamen Resistenzquellen
2. Genetische Kartierung von Resistenz Genen in hoch resistentem Zuchtmaterial
3. Identifizierung von molekularen Markern für die Anwendung in der Züchtung
4. Bereitstellung von resistenten Zuchtlinien an die praktischen Weizenzüchter
5. Weitere Tätigkeiten

Eine Übersicht der Arbeitspakete und der einzelnen Arbeitsschritte für die 3 Projektjahre findet sich in *Tabelle 1*. Der Arbeitsschwerpunkt des Projektes lag auf der genetischen Kartierung von Resistenz Genen und der damit einhergehenden Identifizierung von assoziierten molekularen Markern, um in Folge in der praktischen Weizenzüchtung frühes Zuchtmaterial auf Resistenz hin zu testen und geeignete resistente Linien identifizieren zu können.

In Vorarbeiten bis 2013 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Herbert Huss vom Institut für Biologische Landwirtschaft LFZ Raumberg-Gumpenstein einige hoch resistente Winterweizen Linien identifiziert. Bei diesen handelte es sich einerseits um alte Landsorten aus der Türkei, andererseits um Sorten aus den USA – also „exotisches“, an unsere österreichischen Anbaubedingungen *nicht* angepasstes Zuchtmaterial. Es wurden mehrere Kartierungspopulationen erstellt, welche auf Kreuzungen zwischen diesen hoch resistenten (Land-) Sorten und agronomisch angepassten aber anfälligen heimischen Sorten basierten. 6 dieser Kartierungspopulationen, jeweils ca. 100 homozygote Kreuzungsnachkommen umfassend, wurden im Rahmen unseres Projektes in mehrjährigen Feldversuchen auf Resistenz gegenüber Steinbrand und Zwergsteinbrand geprüft. Des Weiteren wurden bis *dato* in Österreich nicht getestete potentiell resistente Linien, das Differentialsortiment, aktuell im biologischen Anbau verwendeten Weizenlinien, sowie Zuchtmaterial von Züchtern im In- und Ausland getestet. Drei ausgewählte Kartierungspopulationen wurden mittels SNP Chip Technologie genotypisiert. Die gemeinsame Auswertung von Genotyp und Phänotyp Daten ermöglichte, Lage und Wirkung jener Abschnitte im Weizengenom zu bestimmen, welche Resistenz gegenüber Steinbrand und Zwergsteinbrand vermitteln und assoziierte molekulare Marker zu identifizieren. Im Rahmen des Projektes

generierte resistente Zuchtlinien können als Kreuzungseltern für die praktische Weizenzüchtung bereitgestellt werden.

Das vorliegende Projekt (Akronym: „COBRA-Austria“) wurde im Rahmen des Core-Organic II (ERA-NET) Projektes COBRA (Coordinating Organic plant Breeding Activities for diversity) als Teil von WP1 Task 1.2 realisiert, welcher schwerpunktmäßig samenbürtige Krankheiten zum Thema hatte. Als Vertreter Österreichs im COBRA Projekt lag uns seit Projekt Start an einer guten Vernetzung mit Partnern aus dem Ausland. Während der gesamten Laufzeit des Projektes haben wir mit den in *Tabelle 2* angeführten Institutionen im Rahmen von COBRA einen regen Austausch gepflegt. Dies betrifft einerseits die Durchführung von Resistenzprüfungen auf auswärtigen Flächen, andererseits den Wissensaustausch. Besonders ist hervorzuheben, dass wir den Weizenzüchter Prof. David Hole von der Utah State University in Logan (Utah, USA) als essentiellen Kooperationspartner für Zwergsteinbrand Resistenzprüfungen der Kartierungspopulationen für die Versuchsjahre 2015 und 2016 gewinnen konnten, mit dem auch eine Zusammenarbeit in Folgeprojekten geplant ist.

	Vorarbeiten bis 2013	Jahr 1 2014	Jahr 2 2015	Jahr 3 2016
Erschließung neuer Resistenzquellen	xx	x	x	x
Genetische Kartierung von Resistenzgenen				
Erstellen von Kartierungspopulationen	xxx			
Resistenzprüfung von Kartierungspopulationen	x	xx	xxx	xxx
Auswahl von Kartierungspopulationen		xx	xx	
Genotypisieren von 3 Kartierungspopulationen			xx	
Statistische Auswertung der Daten		x	xx	xxx
Entwicklung molekularer Marker				xx
Bereitstellung von Zuchtlinien				x
Weitere Tätigkeiten				
Stakeholdermeeting M6		x		
Stakeholdermeeting M30			x	

Tabelle 1 Übersicht Arbeitspakete und Arbeitsschritte 2013 bis 2016

Land	Institut, Kontaktperson
Tschechien	Crop Research Institute (CRI), Dr. V. Dumalasova
Deutschland	Bayrische Landesanstalt für Landwirtschaft (LFL), Dr. B. Killermann, Dr. B. Voit, DI R. Bauer
Schweden	Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Dr. I. Ahmann
Dänemark	Agrologica, Dr. A. Borgen

Tabelle 2 Übersicht COBRA Partner

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Pflanzenmaterial

In Vorarbeiten bis 2013 wurden mehrere Kartierungspopulationen erstellt, welche auf Kreuzungen zwischen hoch resistenten exotischen Winterweizen – Blizzard, Bonneville, PI119333, M822123 und PI560841 – und anfälligen heimischen Sorten – Rainer, Midas und Pannonikus – basierten. Die Nachkommenschaften dieser Kreuzungen wurden über Einkorn-Ramsche bis zur F5 Generation weitergeführt, so dass für alle Kreuzungen ab 2014 bzw. 2015 100-130 weitgehend homozygote RILs (Recombinant Inbred Lines) in ausreichender Saatgutmenge für das Projekt zur Verfügung standen. Diese Kreuzungen, insgesamt 6 Resistenzquellen (s.o.) zuzuordnen, wurden umfangreichen Steinbrand und Zwergsteinbrand Resistenzprüfungen im Jahr 2015 und 2016 unterzogen. Einzelne Populationen konnten bereits 2014 vollständig getestet werden. Drei dieser Kartierungspopulationen wurden Ende 2015 für die Genotypisierung mittels SNP Chip Technologie ausgewählt und Resistenz Loci und assoziierte molekulare Marker mittels QTL Analyse bestimmt. *Tabelle 3* liefert eine Übersicht über die Kartierungspopulationen, welche in diesem Projekt Verwendung fanden.

Population	Nr.	Kreuzung	Anzahl RILs	Auswahl SNP Chip
Blizzard	1	Blizzard/Rainer	120	x
Bonneville	2	Bonneville/Rainer	120	x
PI119333	4	PI119333/Midas	20	x
		PI119333/Pannonikus	20	
		PI119333/Rainer	80	x
M822123	3	M822123/Rainer	100	
PI178383	5	PI178383/Midas	80	
		PI178383/Rainer	50	
PI560841	6	PI560841/Midas	60	
		PI560841/Rainer	60	

Tabelle 3 Übersicht Kartierungspopulationen 2014 bis 2016

3.2 Feldversuche

Tabelle 4 listet die Versuchsstandorte und detaillierten Versuchsbedingungen von 2014 bis 2016 auf. Für die Steinbrand Resistenzprüfungen wurde das Saatgut künstlich mit einer *T. tritici* Sporenmischung inokuliert; für Zwergsteinbrand Resistenzprüfungen wurden der Boden mit einer *T. controversa* Sporenmischung infiziert. Die Sporenmischungen setzen sich jeweils zu gleichen Teilen unterschiedlicher Herkunft zusammen, welche die in Ost- und Westösterreich aktuell vorkommenden Rassen repräsentieren sollten. Elternlinien, Vergleichslinien und das Differentialsortiment wurden in größtmöglichem Umfang an zusätzlichen Standorten im Ausland bei COBRA Partnern getestet. *Tabelle 5* listet die 2014 bis 2016 bei COBRA Partnern durchgeführten Feldversuche auf. In allen Resistenzprüfungen diente die Sorte Capo, welche die in Österreich nach wie vor am weitesten verbreitete Winterweizen Sorte im biologischen Landbau ist und rund ein Drittel der biologischen (Qualitäts-)

Winterweizenanbaufläche einnimmt, als Standard. Capo ist sowohl gegenüber Steinbrand als auch Zwergsteinbrand hoch anfällig, und lässt Rückschlüsse auf den Erfolg der künstlichen Infektion mit Steinbrand bzw. Zwergsteinbrand Sporen zu: Ein Capo Befall von mindestens 30% ist für aussagekräftige Daten – insbesondere was die Auswertung der Kartierungspopulationen anbetrifft – unabdingbar. Der Krankheitsbefall wurde für jede getestete Linie als % befallene Ähren je Parzelle (Doppelreihen von je 1.5 m Länge) bonitiert.

3.3 Statistische Auswertung der Daten

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit der Software R (Version 3.1.3).

Feldversuche, in denen Capo einen Krankheitsbefall von mindestens 30% aufwies, wurden als aussagekräftig betrachtet: für Steinbrand konnten die Feldversuche CB_TUL14, CB_TUL15, CB_TUL16 (Common Bunt = Steinbrand) und der Glashausversuch CB_GH16 verrechnet werden; für Zwergsteinbrand konnten die Feldversuche DB_UTA15 und DB_UTA16 (Dwarf Bunt = Zwergsteinbrand) verrechnet werden (siehe *Tabelle 4*). Jede Population wurde separat analysiert, für jeweils alle Versuchslinien einer Population wurden die Befallswerte (% befallene Ähren) sowohl für die einzelnen Feldversuche (Umwelten), als auch über die Steinbrand bzw. Zwergsteinbrandumwelten hinweg (Gesamtmittelwert) mittels Mixed Model Analyse mit dem R Package R/asreml berechnet.

Die genetische Charakterisierung der drei ausgewählten Kartierungspopulationen erfolgte mittels Illumina 15K SNP Array, genetische Karten wurden für jede der Kartierungspopulationen mit dem R Package R/ASMap erstellt, nachfolgend erfolgte die gemeinsame statistische Auswertung der phänotypischen und genotypischen Daten (QTL Analyse) mit dem R Package R/qtl, um die Resistenz Loci im Weizengenom zu lokalisieren und assoziierte SNP Marker zu identifizieren. Die QTL Analyse erfolgte jeweils für den Gesamtmittelwert über drei (Steinbrand) bzw. zwei (Zwergsteinbrand) Umwelten hinweg, die identifizierten QTL wurden dann in den einzelnen Umwelten verifiziert.

Resistenzprüfungen 2014	Steinbrand	Zwergsteinbrand	Zwergsteinbrand
	Tulln	Schönfeld	Lambach
	CB_TUL14	DB_SCH14	DB_LAM14
Pflege Bestand	Konventionell	Konventionell	Biologisch
Aussaat	08.11.2014	11.10.2013	13.10.2013
Saatsstärke (kg/ha)	180	180	180
Parzellengröße (m ²)	0,50	0,75	1,00
Parzellengröße (Reihen a 1-1.5m)	2	3	10
Versuchsaufbau	RCB, 2 Blöcke	RCB, 3 Blöcke	RCB, 3 Blöcke
Anzahl Kartierungspopulationen	4	10	3
Größe Kartierungspopulation *	7-85	15-98	94-98
Anzahl Parzellen Versuch	290x2	906x3	380x3
Eltern-, Vergleichslinien, Differentialsortiment	Ja	Ja	Ja
Anzahl Parzellen Extern (inkl. COBRA Partner)	31	120	0
Europäischer Ringtest	Nein	Nein	Nein
Inokulation (Oktober/November)	Saatgut	Boden	Boden
Sporen Konzentration	0.75 g/100g	0.4 g/m ²	0.4 g/m ²
Abdeckung Vlies (November-April)	Nein	Ja	Ja
Erfolgreiche Infektion	Ja	Nein	Nein
Capo % Befall	76.0 (SD=7.1)	2.9 (SD=2.2)	2.3 (SD=1.3)

Resistenzprüfungen 2015	Steinbrand	Zwergsteinbrand	Zwergsteinbrand	Zwergsteinbrand
	Tulln	Utah (USA)	Schönfeld	Tulln
	CB_TUL15	DB_UTA15	DB_SCH15	DB_TUL15
Pflege Bestand	Konventionell	Konventionell	Konventionell	Konventionell
Aussaat	01.11.2014	06.10.2014	10.10.2014	31.10.2014
Saatsstärke (kg/ha)	180	180	180	180
Parzellengröße (m ²)	0,50	0,25	0,50	1,00
Parzellengröße (Reihen a 1-1.5m)	2	1	2	10
Versuchsaufbau	RCB, 2 Blöcke	RCB, 2 Blöcke	RCB, 2 Blöcke	RCB, 2 Blöcke
Anzahl Kartierungspopulationen	6	6	4	2
Größe Kartierungspopulation *	120-130	120-130	120-130	120-130
Anzahl Parzellen Versuch	868x2	850x2	574x2	352x2
Eltern-, Vergleichslinien, Differentialsortiment	Ja	Ja	Ja	Ja
Anzahl Parzellen Extern (inkl. COBRA Partner)	124	0	74	0
Europäischer Ringtest	Ja	Nein	Nein	Nein
Inokulation (Oktober/November)	Saatgut	Boden	Boden	Boden
Sporen Konzentration	0.75 g/100g	5.2 g/m ²	1.5 g/m ²	1.5 g/m ²
Abdeckung Vlies (November-April)	Nein	Nein	Ja	Ja
Erfolgreiche Infektion	Ja	Ja	Nein	Nein
Capo % Befall	62.6 (SE 0.7)	37.5 (SE 0.6)	4.5 (SE 0.3)	10.1 (SE 0.2)

Resistenzprüfungen 2016	Steinbrand	Steinbrand	Zwergsteinbrand	Zwergsteinbrand
	Tulln	Glashaus Tulln	Utah (USA)	Schönfeld
	CB_TUL16	CB_GH16	DB_UTA16	DB_SCH16
Pflege Bestand	Konventionell	Konventionell	Konventionell	Konventionell
Aussaat	13.11.2015	13.12.2015	6.10.2015	13.10.2015
Saatsstärke (kg/ha)	180		180	180
Parzellengröße (m ²)	0,50	10 Pflanzen/Topf	0,25	0,50
Parzellengröße (Reihen a 1-1.5m)	2	Töpfe	1	2
Versuchsaufbau	RCB, 2 Blöcke	RCB, 2 Blöcke	RCB, 2 Blöcke	RCB, 2 Blöcke
Anzahl Kartierungspopulationen	6	2	3	3
Größe Kartierungspopulation *	120-130	120	120	120
Anzahl Parzellen Versuch	868x2	266x2	452x2	456x2
Eltern-, Vergleichslinien, Differentialsortiment	Ja	Ja	Ja	Ja
Anzahl Parzellen Extern (inkl. COBRA Partner)	69x2	0	0	69x2
Europäischer Ringtest	Ja	Nein	Nein	Nein
Inokulation (Oktober/November)	Saatgut	Saatgut	Boden	Boden
Sporen Konzentration	0.75 g/100g	0.75 g/100g	5.2 g/m ²	2.5 g/m ²
Abdeckung Vlies (November-April)	Nein	Nein	Nein	Ja
Erfolgreiche Infektion	Ja	Ja	Ja	Nein
Capo % Befall	81.2 (SE=2.7)	100.0 (SE=0)	60.4 (SE=1.6)	3.3 (SE=0.3)

Tabelle 4 COBRA Austria Versuchsstandorte und Versuchsbedingungen 2014 bis 2016

Blau (Steinbrand) bzw. rot (Zwergsteinbrand) unterlegt sind jeweils die Versuche, welche eine erfolgreiche künstliche Infektion kennzeichnete (Capo Infektion >30%).

Resistenzprüfungen 2014	Steinbrand	Zwergsteinbrand	Zwergsteinbrand	Steinbrand
	Schweden	Tschechien	Deutschland	Schweden
	CB_SWE14	DB_CZR14	DB_LFL14	CB_SWE15
Eltern-, Vergleichslinien, Differentialsortiment	Ja	Ja	Ja	Ja
Inokulation (Oktober/November)	Saatgut	Boden	Boden (natürlich)	Saatgut
Erfolgreiche Infektion	Ja	(Ja)	Nein	Ja
Capo % Befall	96.6 (SD=3.3)	20.9 (SD=7.2)	5.5 (SD=2.0)	87.5 (SE 13.5)

Resistenzprüfungen 2015	Steinbrand	Zwergsteinbrand	Zwergsteinbrand	Zwergsteinbrand
	Schweden	Schweden	Tschechien	Deutschland
	CB_SWE15	DB_SWE15	DB_CZR15	DB_LFL15
Eltern-, Vergleichslinien, Differentialsortiment	Ja	Ja	Ja	Ja
Inokulation (Oktober/November)	Saatgut	Boden (natürlich)	Boden	Boden (natürlich)
Erfolgreiche Infektion	Ja	(Ja)	Nein	Nein
Capo % Befall	87.5 (SE 13.5)	24.2 (SE 2.1)	5.2 (SE 0.9)	3.4 (SE 0.7)

Resistenzprüfungen 2016	Zwergsteinbrand	Zwergsteinbrand
	Tschechien	Deutschland
	DB_CZR16	DB_LFL16
Eltern-, Vergleichslinien, Differentialsortiment	Ja	Ja
Inokulation (Oktober/November)	Boden	Boden (natürlich)
Erfolgreiche Infektion	Nein	Nein
Capo % Befall	3.6 (SE=1.2)	3.9 (SE=0.6)

Tabelle 5 COBRA Partner Versuchsstandorte und Versuchsbedingungen 2014 bis 2016

Blau (Steinbrand) bzw. rot (Zwergsteinbrand) unterlegt sind jeweils die Versuche, welche eine erfolgreiche künstliche Infektion kennzeichnete (Capo Infektion >20%).

4. ERGEBNISSE

Im Folgenden werden die von 2014 bis 2016 geplanten und erfolgreich durchgeführten Arbeitspakete (siehe *Tabelle 1*) beschrieben und die Ergebnisse je Arbeitspaket dargestellt.

4.1 Erschließung neuer Resistenzquellen

Aktuell resistente Weizensorten basieren auf einigen wenigen Resistenzquellen, die genetische Basis der Steinbrand bzw. Zwergsteinbrand Resistenz ist somit aktuell eine sehr enge (Goates & Bockelman 2012). Umso wichtiger ist es, neue resistente Linien zu identifizieren, und ihre Eignung als Resistenzquellen für die Resistenzzüchtung zu untersuchen. In dem vorliegenden Projekt wurden folgende hochwirksamen Resistenzquellen für die unmittelbare Verwendung in der Resistenzzüchtung erschlossen: **Blizzard**, **Bonneville**, **PI119333**, **M822123**, **PI178383** und **PI560841** wurden bereits in Vorversuchen als hochresistent identifiziert, und fanden als Kreuzungspartner mit den angepassten Sorten Rainer, Midas und Pannonikus Eingang in die im vorliegenden Projekt untersuchten Kartierungspopulationen. Für die drei Resistenzquellen Blizzard, Bonneville und PI119333 wurden die Resistenz Loci im Weizen genom und assoziierte molekulare Marker identifiziert; für die drei weiteren Resistenzquellen M822123, PI178383 und PI560841 konnten hinsichtlich Anzahl und Wirkung der Resistenz Gene aussagekräftige Daten gewonnen werden (siehe Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2).

Folgende hochwirksame neuartige Resistenzquellen (Genbankeinträge) wurden für die Verwendung in der Resistenzzüchtung in Österreich identifiziert: **PI636156**, **PI636165**, **PI636166** (= PI560841-bcl), **PI636170**, und **PI362695**. Bei diesen handelt es sich um Genbankeinträge mit Herkunft Türkei, welche in Goates & Bockelmann (2012) in Resistenztests in den USA als resistent gegenüber allen bekannten *T. Rassen* angeführt wurden. Diese Genbankeinträge wurden in unseren Resistenzprüfungen mitgetestet und wiesen über die Jahre und Orte hinweg eine sehr hohe Steinbrand bzw. Zwergsteinbrand Resistenz auf (Befallswerte <2.5 %). Des Weiteren wurden die Linien im Rahmen des „European Tilletia Ringtest“ in bis zu 12 unterschiedlichsten Ländern getestet: PI636170 und PI362695 zeigten hier über alle (!) Orte hinweg sehr gute Resistenz (Befallswerte <1%); PI636156, PI636165, PI636166 erwiesen sich in durchwegs allen Versuchen als resistent – mit Ausnahme von Test mit spezifischen Steinbrand Rassen in Dänemark. Mit Projektabschluss stehen somit erneut resistente Kreuzungspartner zur Verfügung, um Kartierungspopulationen mit angepassten heimischen Weizensorten zu erstellen.

4.2 Genetische Kartierung von Resistenzgenen

Die Hauptarbeit des vorliegenden Projektes bestand in der genetischen Kartierung von Resistenzgenen in hochresistentem Zuchtmaterial, und umfasst mehrere Arbeitsschritte (siehe *Tabelle 1*), welche im Folgenden detailliert beschrieben werden.

4.2.1 Erstellen von Kartierungspopulationen

In Vorarbeiten wurden mehrere Kartierungspopulationen erstellt, welche auf

Kreuzungen zwischen hoch resistenten exotischen Sorten und anfälligen heimischen Sorten basierten (siehe Abschnitt 3.1). 2014 wurde eine Vorauswahl von Populationen für den Anbau 2015 und 2016 getroffen, und zwar basierend auf 1) Resistenzquelle, 2) Größe der Population (=Anzahl der zur Verfügung stehenden homozygoten RILs) und 3) Homogenität der RILs einer Population. Diese Kartierungspopulationen sind 6 Resistenzquellen zuzuordnen:

a) Träger von *Bt* Genen:

M822123 (*Bt11*), PI119333 (*Bt12*), PI178383 (*Bt8*, *Bt9*, *Bt10*)

b) Träger von unbekanntem Resistenz Genen:

Blizzard, Bonneville, PI560841

M822123, PI119333, PI178383 und PI560841 sind jeweils Landsorten türkischen Ursprungs oder direkt auf solche zurückzuführen; Bei Blizzard und Bonneville handelt es sich um hoch resistente Sorten aus den USA. Der Umfang der auf diesen Resistenzquellen basierenden 6 „Megapopulationen“ umfasst jeweils 100-130 Linien, für einen Überblick, siehe *Tabelle 3*. Die Populationen wurden umfangreichen Steinbrand und Zwergsteinbrand Resistenzprüfungen von 2014 bis 2016 unterzogen. Zwei Populationen konnten bereits 2014 vollständig getestet werden, 2015 und 2016 stand für alle 6 Populationen die vollständige Anzahl Linien zur Verfügung.

4.2.2 Resistenzprüfungen

2014 bis 2016 wurden in Feldversuchen für 6 ausgewählte Populationen Steinbrand und Zwergsteinbrand Resistenztests in Österreich und den USA durchgeführt (siehe *Tabelle 4*). Zusätzlich zu den Kartierungspopulationen wurden die resistenten und anfälligen Elternlinien, Vergleichslinien und das gesamte Differentialsortiment getestet.

Das Jahr 2014 diente vornehmlich der Auswahl von Populationen, im Jahr 2015 und 2016 wurden die ausgewählten 6 Kartierungspopulationen in vollem Umfang von je 100-130 Linien an mehreren Standorten in Feldversuchen auf Resistenz gegenüber Steinbrand und Zwergsteinbrand in Österreich und den USA getestet; *Tabelle 6* liefert eine Übersicht über die COBRA Austria Kartierungspopulationen und erfolgreich erhobenen Versuchsdaten (Umwelten).

Die künstliche Infektion mit Steinbrandsporen für die Feldversuche in Österreich (Tulln) war in jedem Versuchsjahr erfolgreich, die Auswertung der Versuche konnte jeweils unter optimalen Befallsbedingungen durchgeführt werden. Die künstliche Infektion mit Zwergsteinbrand in Österreich (Schönfeld, Lambach und Tulln) wies in jedem Versuchsjahr ein zu geringes, in den USA (Utah) ein sehr gutes Befalls Niveau auf, so dass letztendlich nur die Zwergsteinbrand Versuche in den USA zufriedenstellend ausgewertet werden konnten. Die Witterungsbedingungen in Österreich in den Wintern 2013/14 bis 2015/16 (verhältnismäßig warme Temperaturen, keine durchgängige Schneedecke) waren sehr ungünstig für die Krankheitsentwicklung von Zwergsteinbrand. Auch in Utah handelte es sich 2014/15 um den wärmsten Winter seit Jahrzehnten, mit einer verhältnismäßig kurz ausgeprägten dauerhaften Schneedecke, 2015/16 hingegen wies optimale Witterungsbedingungen auf. Bekanntermaßen ist es schwer, künstlich eine starke Zwergsteinbrand Infektion zu provozieren, da dieser – im Gegensatz zu gewöhnlichem Steinbrand – sehr sensibel auf Abweichungen von den

optimalen Bedingungen reagiert: Eine durchgehende Schneedecke sorgt für stabil niedrige Temperaturen (3-8°C), hohe Luftfeuchtigkeit und spezielle Lichtverhältnisse, welche für eine erfolgreiche Krankheitsentwicklung notwendig sind (Goates 1996). Für das vorliegende Projekt war es also umso wichtiger, mehrere Versuchsjahre und -orte zur Verfügung zu haben, um zu aussagekräftigen Ergebnissen betreffend Zwergsteinbrand zu kommen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die einzelnen Populationen, sowie für Elternlinien und Differentialsortiment beschrieben.

Steinbrand Resistenzprüfungen			Steinbrand Tulln CB_TUL14	Steinbrand Tulln CB_TUL15	Steinbrand Tulln CB_TUL16	Steinbrand Glashaus CB_GH16
Population	Kreuzung	Anzahl RILs				
Blizzard	Blizzard/Rainer	120		120	120	120
Bonneville	Bonneville/Rainer	120		120	120	120
PI119333	PI119333/Midas	20		20	20	
	PI119333/Pannonikus	20		20	20	
	PI119333/Rainer	80	85	80	80	
M822123	M822123/Rainer	100		100	100	
PI178383	PI178383/Midas	80	71	80	80	
	PI178383/Rainer	50	7	50	50	
PI560841	PI560841/Midas	60		60	60	
	PI560841/Rainer	60		60	60	

Zwergsteinbrand Resistenzprüfungen			Zwergsteinbrand Utah (USA) DB_UTA15	Zwergsteinbrand Utah (USA) DB_UTA16
Population	Kreuzung	Anzahl RILs		
Blizzard	Blizzard/Rainer	120	120	120
Bonneville	Bonneville/Rainer	120	120	120
PI119333	PI119333/Midas	20	20	
	PI119333/Pannonikus	20	20	
	PI119333/Rainer	80	80	
M822123	M822123/Rainer	100	100	
PI178383	PI178383/Midas	80	80	
	PI178383/Rainer	50	50	
PI560841	PI560841/Midas	60	60	60
	PI560841/Rainer	60	60	60

Tabelle 6 Übersicht über die COBRA Austria Kartierungspopulationen und erfolgreich erhobenen Versuchsdaten

a. Ergebnisse Resistenzprüfungen für Kartierungspopulationen

Eine Übersicht über die Ergebnisse der Resistenzprüfungen von 2014 bis 2016 für die einzelnen Populationen ist in *Tabelle 7* zu finden. Die Qualität der Versuche, welche aus der Wiederholbarkeit der Befallswerte abzuleiten ist, war für alle Populationen sehr zufriedenstellend. Sowohl bei der Steinbrand- als auch Zwergsteinbrandresistenz handelt es sich um Merkmale mit hoher Heritabilität ($H^2=0.83-0.97$). Für alle Populationen konnten signifikante Unterschiede für Steinbrand- bzw. Zwergsteinbrandbefall zwischen den Linien der jeweiligen Populationen festgestellt werden. Die Häufigkeitsverteilung und Anzahl von resistenten und anfälligen Linien ließ für die einzelnen Populationen Rückschlüsse auf die wahrscheinliche Anzahl der wirkenden Resistenz Gene zu (siehe *Tabelle 8*, *Abbildung 1*, *Abbildung 2*).

Für die Populationen Blizzard, Bonneville und PI560841 konnten aussagekräftige Daten sowohl für Steinbrand als auch für Zwergsteinbrand erhoben werden:

Die Häufigkeitsverteilung von resistenten und anfälligen Linien für **Blizzard** und **Bonneville** legt die Vermutung nahe, dass es sich um zwei Resistenz Gene handelt, welche Steinbrand Resistenz vermitteln, da das Verteilungsmuster nicht signifikant von einer 3:1 Verteilung abweicht; des Weiteren sprechen die Verteilungsmuster fürs Vorhandensein von einem (Blizzard) bzw. zwei (Bonneville) Resistenzgenen, welche Zwergsteinbrand Resistenz vermitteln. Eine solch stabile, durch einige wenige Gene vermittelte Resistenz ist in der praktischen Züchtung realistisch zu integrieren und somit wünschenswert. Die Häufigkeitsverteilung von resistenten und anfälligen Linien für **PI560841** – türkische Landsorte und Trägerin unbekannter Resistenzgene – deutet unter Steinbrandbefall auf eine typisch quantitative Resistenz hin: Eine Kombination von vielen Resistenz Loci, von denen jeder alleine nur einen kleinen Teil der Resistenz bewerkstelligen kann, vermittelt gute Resistenz; nur wenige Linien innerhalb der Population weisen somit komplette Resistenz auf. Die Häufigkeitsverteilung bei Zwergsteinbrandbefall liefert Hinweise auf zwei unabhängig voneinander wirkende Resistenz Gene. Quantitative Resistenz wäre zwar – einmal in einer Sorte vorhanden – sehr dauerhaft, ist aber in der praktischen Züchtung schwer einsetzbar, da das Kombinieren vieler Gene notwendig ist, um ein gutes Resistenzniveau zu erreichen.

Für die Populationen PI119333, M822123 und PI178383 – alles türkische Landsorten bzw. Abkömmlinge dieser – konnten aussagekräftige Daten für Steinbrand erhoben werden:

PI119333 ist eine Linie des Differentialsortiments und enthält das breit wirksame, bis *dato* nicht kartierte Resistenzgen *Bt12*. Die Häufigkeitsverteilung von resistenten und anfälligen Linien unterstützt die Theorie, das PI119333 Trägerin von einem dominant wirkenden Resistenzgen ist. **M822123** ist ebenso im Differentialsortiment zu finden und enthält *Bt11*. Die Häufigkeitsverteilung von resistenten und anfälligen Linien deutet jedoch darauf hin, dass zwei gleichwertige Resistenzgene in dieser Linie vorhanden sein müssen. Für **PI178383** – Trägerin von *Bt8*, *Bt9* und *Bt10* – deutet die Häufigkeitsverteilung auf das Vorhandensein von 2 gleichwertigen, nicht gekoppelten Resistenzgenen hin, was auch damit zu tun haben könnte, dass 2 dieser 3 *Bt* Gene de facto so eng beisammen liegen, dass sie als eines wirken.

Die für alle Populationen beobachtete Variabilität im anfälligen Bereich legt die Vermutung nahe, dass die Resistenzantwort durch den Effekt sogenannter „Minor Genes“ moduliert wird.

Population	Inokulum	Versuch	Daten	Elter R [%]	Elter1 A [%]	Elter2 A [%]	Min [%]	Mean [%]	Median [%]	Max [%]	SD [%]	H2	LSD5 [%]	Cutoff [%]
Blizzard	Steinbrand	CB_TUL14												
		CB_TUL15	x	1,3	79,3		0,0	13,0	2,8	79,3	21,0	0,99	6,33	7,63
		CB_TUL16	x	0,0	83,2		0,0	12,4	2,3	87,9	21,9	0,99	6,12	6,12
		CB_GH16	x	1,9	84,4		0,0	26,0	8,3	100,0	31,6	0,92	25,22	27,14
	CB_MET			1,1	84,2		0,0	17,2	6,4	84,2	23,9	0,94	16,80	17,88
	Zwergsteinbrand	DB_UTA15	x	0,3	22,9		0,0	9,9	6,2	44,7	10,4	0,93	7,72	7,97
		DB_UTA16	x	0,9	26,8		0,0	18,4	15,1	56,0	13,1	0,89	12,21	13,13
		DB_MET			0,6	22,9		0,0	14,2	12,1	50,3	10,9	0,83	12,38
Bonneville	Steinbrand	CB_TUL14												
		CB_TUL15	x	0,0	83,1		0,0	11,1	2,1	83,1	19,1	0,98	6,73	6,73
		CB_TUL16	x	0,0	80,8		0,0	10,4	1,8	80,8	18,9	0,99	6,27	6,27
		CB_GH16	x	0,0	100,0		0,0	23,0	5,9	100,0	30,9	0,94	20,55	20,55
	CB_MET			0,0	85,8		0,0	15,0	3,8	85,8	22,4	0,94	15,48	15,48
	Zwergsteinbrand	DB_UTA15	x	0,0	14,0		0,0	5,4	1,8	42,8	8,1	0,95	5,24	5,24
		DB_UTA16	x	0,5	50,8		0,0	12,2	7,3	74,9	14,2	0,88	13,63	14,16
		DB_MET			0,3	30,9		0,0	8,6	4,9	62,1	10,4	0,85	11,41
PI119333	Steinbrand	CB_TUL14	x	0,5	74,5		-1,09912E-14	19,5	9,5	83,5	24,2	0,98	10,01	10,51
		CB_TUL15	x	0,1	82,1		0,0	17,6	7,2	82,1	22,8	0,98	8,70	8,80
		CB_TUL16	x	0,0	82,2		0,0	21,8	17,5	82,2	21,9	0,96	12,05	12,05
		CB_GH16												
	CB_MET			1,3	80,0		0,0	20,0	12,1	80,0	22,5	0,97	9,89	11,22
	Zwergsteinbrand	DB_UTA15												
		DB_UTA16												
		DB_MET												
M822123	Steinbrand	CB_TUL14												
		CB_TUL15	x	0,0	76,7		0,0	7,6	0,0	76,8	16,7	1,00	3,06	3,06
		CB_TUL16	x	0,0	79,1		0,0	6,0	0,0	79,1	15,6	0,99	4,22	4,22
		CB_GH16												
	CB_MET			0,0	79,6		0,0	8,0	0,0	79,6	17,7	0,97	7,81	7,81
	Zwergsteinbrand	DB_UTA15												
		DB_UTA16												
		DB_MET												
PI178383	Steinbrand	CB_TUL14	x	1,59299E-14	80	86	-2,02685E-14	12,6	0,0	86,0	24,6	0,99	6,48	6,48
		CB_TUL15	x	0,1	84,1	86,2	0,0	8,6	0,2	86,2	19,6	0,99	4,08	4,18
		CB_TUL16	x	0,0	69,8	73,2	0,0	7,4	0,3	77,4	16,7	0,98	5,94	5,94
		CB_GH16												
	CB_MET			0,0	78,0	80,8	0,0	9,4	0,9	80,8	18,7	0,95	11,24	11,28
	Zwergsteinbrand	DB_UTA15												
		DB_UTA16												
		DB_MET												
PI560841	Steinbrand	CB_TUL14												
		CB_TUL15	x	0,9	80,5	82,3	0,9	44,1	38,5	89,4	26,6	14,17	15,11	0,96
		CB_TUL16	x	2,8	86,5	82,5	0,0	36,0	32,0	93,2	25,1	15,64	18,45	0,95
		CB_GH16												
	CB_MET			1,9	83,5	82,4	1,9	40,3	36,5	91,3	24,7	21,13	23,01	0,91
	Zwergsteinbrand	DB_UTA15	x	0,4	12,8	29,8	0,0	3,0	1,3	29,8	4,5	3,65	4,02	0,92
		DB_UTA16	x	1,4	36,3	68,3	0,0	13,4	10,1	68,3	13,3	13,60	15,00	0,87
		DB_MET			0,9	26,9	46,9	0,0	7,9	5,7	46,9	8,4	13,22	14,10

Tabelle 7 Überblick über die Ergebnisse der Resistenzprüfungen 2014 bis 2016

Grau unterlegt wurden jeweils die Ergebnisse über die Umwelten hinweg (Multi Environment Trial = MET). Der Cutoff Wert, verwendet um zwischen der resistenten und anfälligen Gruppe zu unterscheiden, errechnet sich aus der Summe Befallswert resistenter Elter und LSD5 Wert.

Population	Inokulum	Versuch	Linien	Resistent	Anfällig	Hypothese	Verteilung (p)
Blizzard	Steinbrand	CB_MET	122	88	34	2 Gene	3:1 (0.46)
	Zwergsteinbrand	DB_MET	122	64	58	1 Gen	1:1 (0.59)
Bonneville	Steinbrand	CB_MET	122	86	36	2 Gene	3:1 (0.25)
	Zwergsteinbrand	DB_MET	122	89	33	2 Gene	3:1 (0.60)
PI119333	Steinbrand	CB_MET	82	82	40	1 Gen	1:1 (0.83)
	Zwergsteinbrand	DB_MET					
M822123	Steinbrand	CB_MET	102	81	21	2 Gene	3:1 (0.30)
	Zwergsteinbrand	DB_MET					
PI178383	Steinbrand	CB_MET	133	104	29	2 Gene	3:1 (0.40)
	Zwergsteinbrand	DB_MET					
PI560841	Steinbrand	CB_MET	123	40	83	quantitativ	
	Zwergsteinbrand	DB_MET	123	100	23	2 Gene	3:1 (0.11)

Tabelle 8 Häufigkeitsverteilung und Anzahl von resistenten und anfälligen Linien für die Populationen

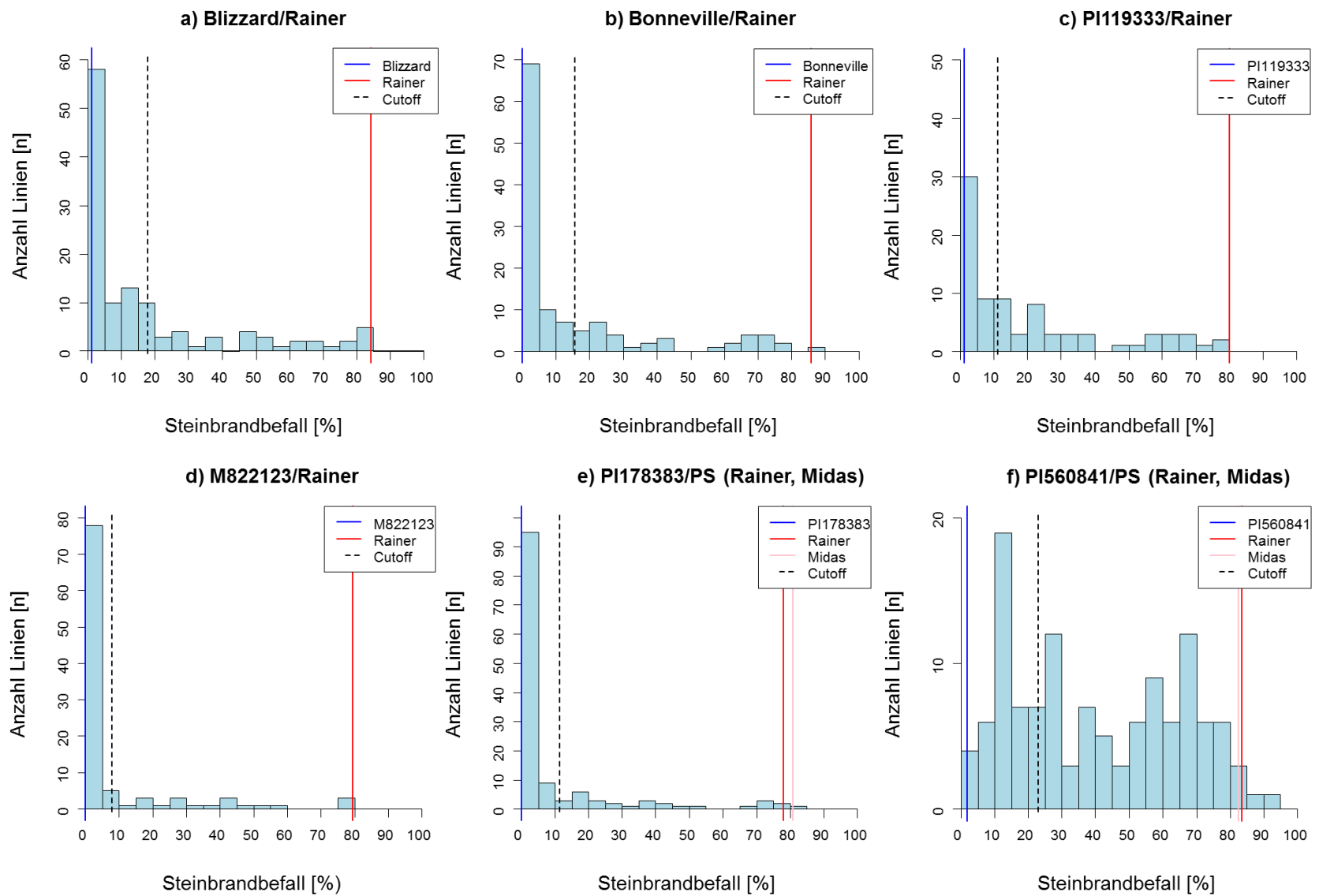


Abbildung 1 Häufigkeitsverteilung von resistenten und anfälligen Linien in Steinbrand Resistenztest

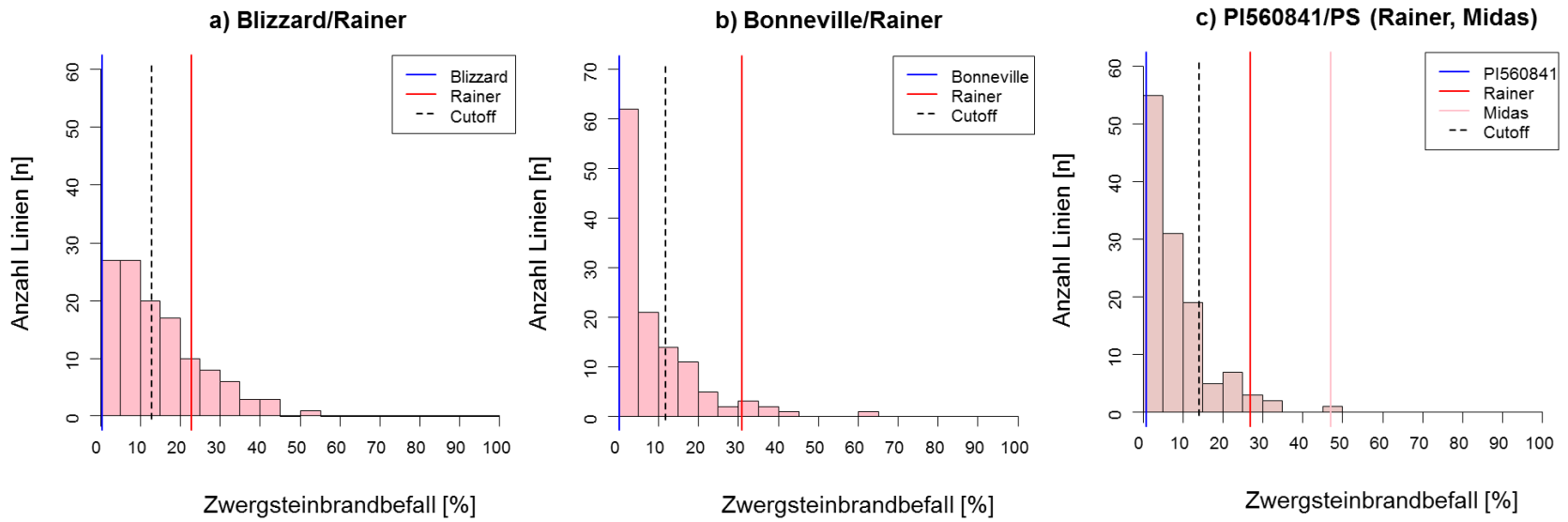


Abbildung 2 Häufigkeitsverteilung und Anzahl von resistenten und anfälligen in Zwergsteinbrand Resistenztest

b. Ergebnisse Resistenzprüfung für Elternlinien und Differentialsortiment

Zusätzlich zu den Standorten in Österreich und den USA, an denen die Populationen getestet wurden, wurden in jeweils größtmöglichem Umfang Elternlinien und das Differentialsortiment auf Steinbrand und Zwergsteinbrand Resistenz bei COBRA Partnern in Schweden, Tschechien und Deutschland geprüft (siehe Tabelle 5). Abgesehen vom Steinbrand Standort Schweden, konnte an keinem dieser zusätzlichen Standorte eine Capo Befall von mindestens 30% erreicht werden. Somit konnten zusätzlich zu den Daten von Tulln und Utah, auch die des Steinbrand Standortes in Schweden zuverlässig ausgewertet werden. Die Daten der anderen (Zwergsteinbrand) Standorte können als Hinweise betrachtet, müssen jedoch mit Sorgfalt genossen werden.

Alle resistenten **Elternlinien** wiesen über die Jahre hinweg an allen Standorten sehr gute Resistenz (Befallswerte <5%) gegenüber Steinbrand und Zwergsteinbrand auf; eine Ausnahme stellt PI560841 in den Steinbrandversuchen in Schweden dar (Befallswert 9%), es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hier um eine Verunreinigung des Saatguts gehandelt hat. Anfällige Elternlinien wiesen – abhängig vom lokalen Infektionsniveau – wie erwartet hohe Befallswerte auf (siehe *Abbildung 3*).

Die Reaktion der **Differentiallinien** gegenüber Steinbrand und Zwergsteinbrand wird in *Abbildung 4* dargestellt: Wenn man Untersuchungen aus vorangegangenen Jahren – insbesondere aus 2006 (Huber & Bürstmayr 2006) – miteinbezieht, bleiben einzig *Bt5*, *Bt11* und *Bt12*, welche gegen beide Krankheiten über die Jahre hinweg verlässliche (monogenische) Resistenz mit Befallswerten < 5% bewirken.

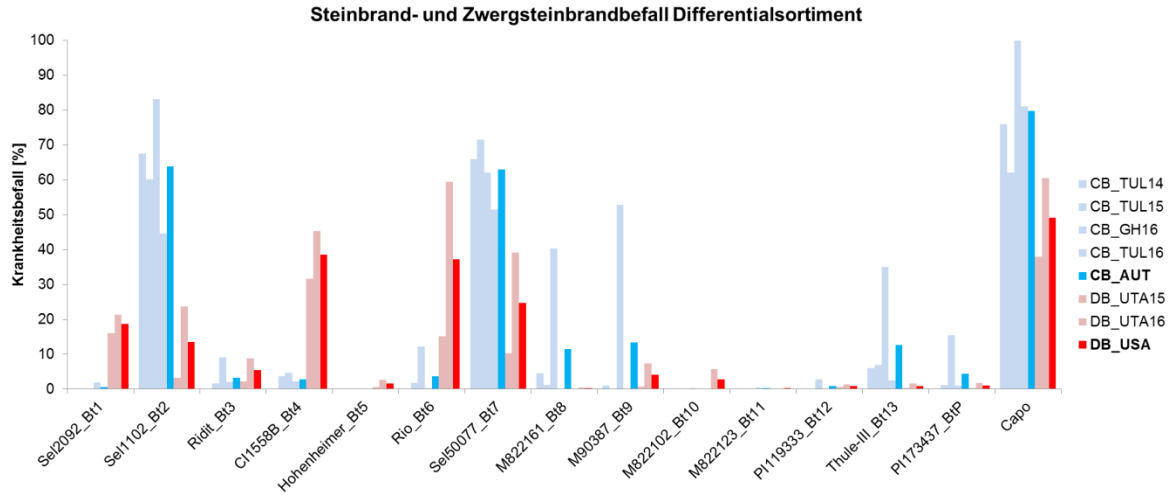


Abbildung 3 Ergebnisse Resistenzprüfungen für Elternlinien

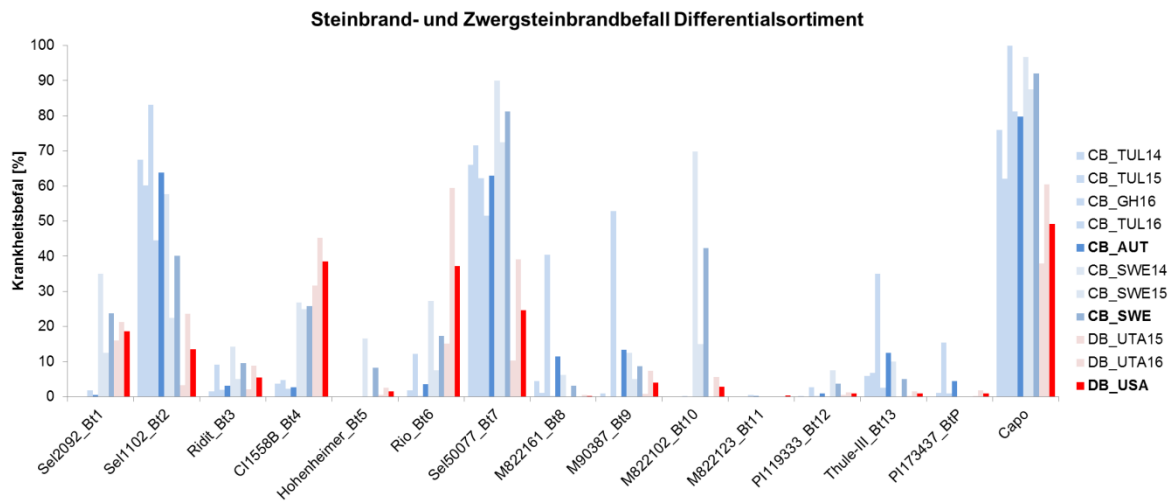


Abbildung 4 Ergebnisse Resistenzprüfungen für Differentialsortiment

4.2.3 Auswahl von Kartierungspopulationen

Basierend auf den Ergebnissen der Resistenzprüfungen 2015, wurden die drei Populationen **Blizzard**, **Bonneville** und **PI119333** für die Genotypisierung mittels SNP Chip Technologie ausgewählt, da diese Träger von je 1-2 hochwirksamen Resistenzgenen sind, welche bis *dato* in Österreich keinen Eingang in die Brandzüchtung gefunden. PI119333 enthält mit *Bt12* ein starkes Resistenzgen; Blizzard und Bonneville sind miteinander verwandte Linien und enthalten mehrere unbekannte Resistenz Gene. Des Weiteren lagen für diese drei Populationen bereits 2015 gute phänotypische Daten für unterschiedliche Umwelten vor, sodass mit ausreichend Umwelten für eine einwandfreie Kartierung der Steinbrand und Zwergsteinbrand Resistenz Gene gerechnet werden konnte.

4.2.4 Genotypisieren von drei Kartierungspopulationen

DNA Proben aller Linien der Populationen Blizzard, Bonneville und PI119333 wurden mittels SNP Chip Technologie (15K Illumina SNP Array, Traitgenetics) genotypisiert. Für jede Population wurde eine genetische Karte erstellt, welche jeweils 1471 (Blizzard), 1431 (Bonneville) und 1214 (PI119333) polymorphe Marker mit einer durchschnittlichen Marker Distanz von 2.3 (Blizzard), 2.5 (Bonneville) und 2.4 (PI119333) centi-Morgan (cM) inkludierte, und mit 31 (Blizzard, Bonneville) bzw. 42 (PI119333) Kopplungsgruppen jeweils alle 21 Weizenchromosomen abdeckte.

4.2.5 Statistische Auswertung der Phänotyp und Genotyp Daten

Die gemeinsame statistische Auswertung der Phänotyp und Genotyp Daten (QTL Analyse), welche die Kartierung der Resistenzgene (QTL) erlaubt, erfolgte für jede Population separat und führte zu den im Folgenden dargestellten Ergebnissen.

a. *Blizzard*

Steinbrand Resistenz Loci

In der Blizzard Kartierungspopulation konnten zwei Steinbrand Resistenz Loci identifiziert werden. Der auf Chromosom **1A** identifizierte QTL erklärte 19.5%, derjenige auf Chromosom **1B** 34.6% der beobachteten phänotypischen Varianz. Des Weiteren konnte eine **Interaktion** zwischen den beiden QTL festgestellt werden, die zusätzliche 9.8% der phänotypischen Varianz erklärte. Die identifizierten QTL können als stabile „major“ QTL bezeichnet werden, welche zusammen mit der Interaktion insgesamt 64% der beobachteten Variation betreffend Steinbrand Resistenz erklärten.

Zwergsteinbrand Resistenz Loci

In der Blizzard Kartierungspopulation konnte ein „major“ QTL für Zwergsteinbrand Resistenz identifiziert werden: Dieser befindet sich auf Chromosom **1A**, ist mit demjenigen, der auch für die Vermittlung von Steinbrand Resistenz verantwortlich ist, ident und erklärt 28% der beobachteten phänotypischen Variation. Zusätzlich wurden QTL geringerer Wirkung auf den Chromosomen **7A** und **7D** identifiziert, welche jeweils 10% der beobachteten Variation betreffend Zwergsteinbrand Resistenz erklärten. Zusammen erklärten die identifizierten QTL insgesamt 48% der beobachteten Variation betreffend Zwergsteinbrand Resistenz.

Das resistente Allel der identifizierten Resistenz Loci auf Chromosom 1A, 1B, 7A und 7D stammte jeweils wie erwartet vom resistenten Elter Blizzard ab.

b. Bonneville

Steinbrand Resistenz Loci

In der Kartierungspopulation Bonneville konnten zwei Steinbrand Resistenz Loci identifiziert werden, welche ident mit den in Blizzard identifizierten waren. Der auf Chromosom **1A** identifizierte QTL erklärte 23.3%, derjenige auf Chromosom **1B** 29.61% der beobachteten phänotypischen Varianz. Des Weiteren konnte eine starke **Interaktion** zwischen beiden QTL festgestellt werden, die zusätzliche 17.35% der phänotypischen Varianz erklärte. Diese „major“ QTL erklärten zusammen mit der identifizierten Interaktion insgesamt 70.2% der beobachteten Variation betreffend Steinbrand Resistenz.

Zwergsteinbrand Resistenz Loci

In der Kartierungspopulation Bonneville konnte ein „major“ QTL für Zwergsteinbrand Resistenz identifiziert werden. Dieser befindet sich auf Chromosom **1A**, ist wiederum mit demjenigen, der auch für die Vermittlung von Steinbrand Resistenz verantwortlich ist, ident und erklärt 27.7% der beobachteten phänotypischen Variation. Zusätzlich wurde ein QTL geringerer Wirkung auf dem Chromosom **7A** identifiziert, welcher zusätzliche 13.2% der beobachteten Variation betreffend Zwergsteinbrand Resistenz erklärte und mit dem in Blizzard identifizierten QTL auf 7A ident ist. Zusammen erklärten die identifizierten QTL insgesamt 40.9% der beobachteten Variation betreffend Zwergsteinbrand Resistenz.

Das resistente Allel der identifizierten Resistenz Loci auf Chromosom 1A, 1B und 7A stammte jeweils wie erwartet vom resistenten Elter Bonneville ab.

c. PI119333

Steinbrand Resistenz Loci

In der Kartierungspopulation PI119333 konnte ein „major“ QTL für Steinbrand Resistenz identifiziert werden, bei dem es sich um das Resistenzgen **Bt12** handeln muss: Der QTL befindet sich auf Chromosom **7D** und erklärt 42.92% der beobachteten phänotypischen Variation. Zusätzlich wurde ein QTL geringerer Wirkung auf dem Chromosom **4B** identifiziert, welcher zusätzliche 10.46% der beobachteten Variation betreffend Steinbrand Resistenz erklärte. Zusammen erklärten die identifizierten QTL insgesamt 53.38% der beobachteten Variation betreffend Steinbrand Resistenz.

Das resistente Allel der identifizierten Resistenz Loci auf Chromosom 4B und 7D stammte jeweils wie erwartet vom resistenten Elter PI119333 ab.

Insgesamt konnten im Rahmen des Projektes COBRA Austria drei hochwirksame Resistenzgene („major“ QTL) identifiziert werden, und zwar auf den Weizenchromosomen 1A, 1B und 7D. Alle QTL eignen sich für die Verwendung in

der Resistenzzüchtung, da sie von hoher Wirksamkeit sind und v.a. in Kombination miteinander sehr stabile Resistenz vermitteln werden.

4.3 Identifizierung von molekularen Markern

Für jeden der in unserem Projekt kartierten Resistenz QTL (siehe Abschnitt 4.2.5) wurden assoziierte SNP Marker identifiziert, welche jeweils mit den Resistenz Loci auf den Weizenchromosomen 1A, 1B und 7D assoziiert sind. Die Details der assoziierten Marker werden im Rahmen von zwei Publikationen in einschlägigen Fachjournalen im Laufe der nächsten Monate offengelegt. *Abbildung 5* illustriert den Effekt, den das Vorhandensein des resistenten Allels des jeweiligen QTL bzw. assoziierten SNP Markers auf den Krankheitsbefall in den unterschiedlichen Populationen hat. Leicht ersichtlich ist, dass eine Kombination mehrere Resistenz Loci, z.B. 1A und 1B zu einer nahezu kompletten Resistenz führt. Die Kombination von zwei Resistenzgenen mittels Marker gestützter Selektion ist keine aufwendige Sache, somit sind die identifizierten Resistenz Loci bzw. assoziierten Marker für die praktische Züchtung von Steinbrand bzw. Zwergsteinbrand resistenten Sorten für den Biolandbau von unmittelbarer Bedeutung.

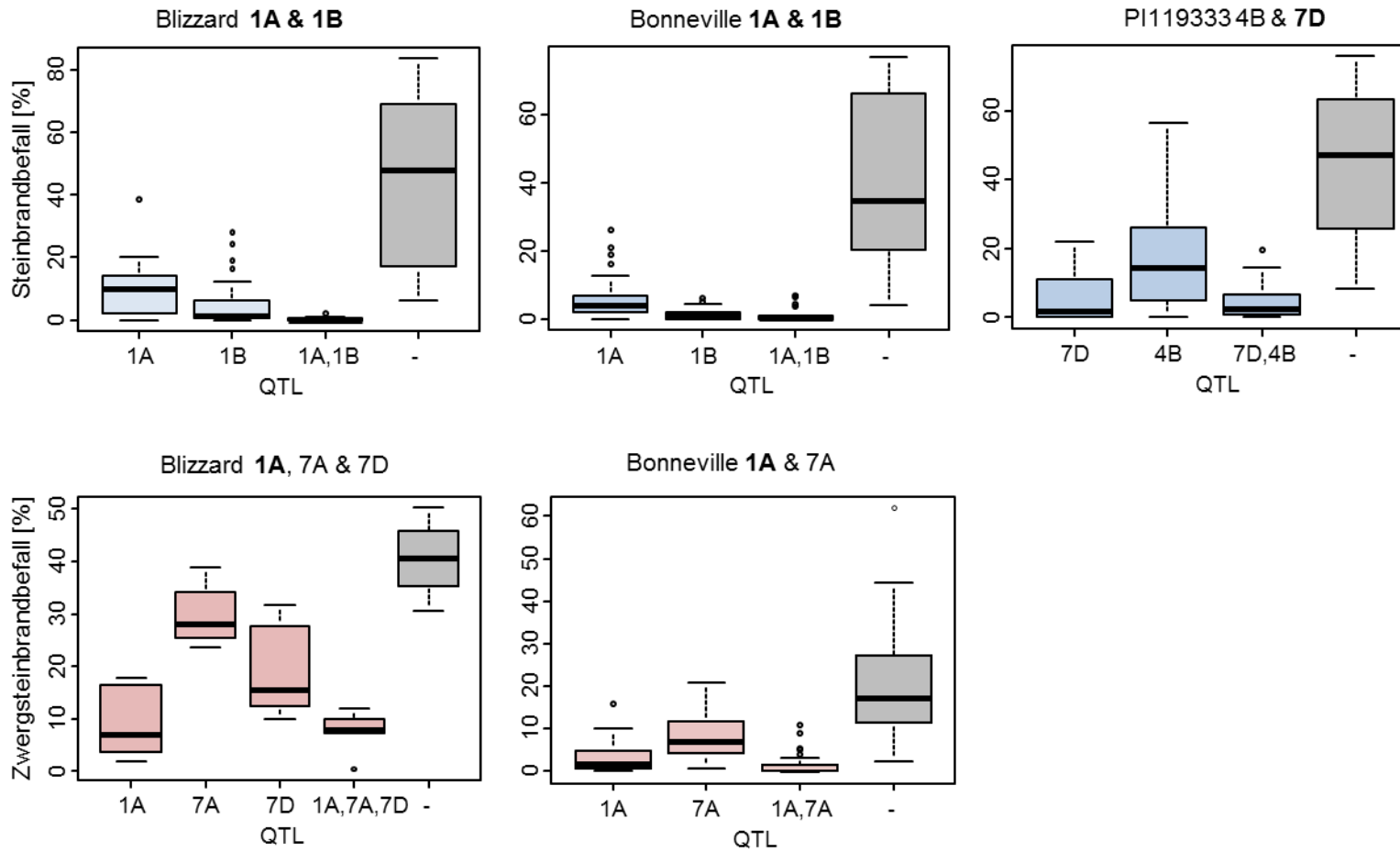


Abbildung 5 Marker Effekt auf den Krankheitsbefall in den Populationen

Hier dargestellt wird der Effekt, den das Vorhandensein des resistenten Allels des jeweiligen QTL bzw. assoziierten SNP Markers auf den Krankheitsbefall in den unterschiedlichen Populationen hat.

4.4 Bereitstellung von resistenten Zuchtlinien

Von allen 6 Kartierungspopulationen, welche auf den Resistenzquellen Blizzard, Bonneville, PI119333, M822123, PI178383 und PI560841 basieren und für dieses Projekt entwickelt wurden, stehen eine Anzahl hoch resistenter Zuchtlinien für die praktische Weizenzüchtung zur Verfügung (*Abbildung 1, Abbildung 2, Abbildung 3, Tabelle 7 und Tabelle 8*), welche bereits rund 50% Erbgut einer angepassten heimischen Sorte enthalten. Für drei dieser Kartierungspopulationen – Blizzard, Bonneville und PI119333 – konnten jeweils diejenigen Linien identifiziert werden, welche die wünschenswerten Resistenz QTL bzw. Kombinationen dieser QTL tragen. Des Weiteren wurde für alle Zuchtlinien nicht nur das Merkmal Steinbrand- bzw. Zwergsteinbrandresistenz über die Jahre hinweg bonitiert, sondern auch andere wichtige agronomische Merkmale wie z.B. Wuchshöhe, Datum Ährenschieben und Krankheitsresistenz (Mehltau, Gelbrost), sodass zusätzlich auch nach diesen Kriterien ausgewählt werden kann, um optimale Kreuzungspartner für die Biozüchtung zu identifizieren.

4.5 Weitere Tätigkeiten

Im Rahmen der alle 2 Jahre abgehaltenen Konferenz „The XVIII Biennial International Workshop on the Smuts and Bunts“, welche im Februar 2013 in Kopenhagen stattfand, wurde das **COBRA Stakeholder Meeting M6** von uns mitorganisiert. Auf dieser Tagung wurde COBRA Austria im Rahmen eines Vortrags vorgestellt, **Kontakte zu anderen COBRA Partnern** wurden intensiviert und **über COBRA hinausgehenden Kooperationen** geschlossen (Prof. David Hole, Utah State University, Logan, USA). Im Rahmen der 65. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs im November 2014 in Gumpenstein wurde das von uns organisierte **COBRA Stakeholder Meeting M30** erfolgreich abgehalten. Außerdem wurde im Rahmen dieser Konferenz ein Vortrag über das COBRA Austria Projekt gehalten; Eine Zusammenfassung des Stakeholder Meetings und ein Extended Abstract des Vortrages wurden im Tagungsband der Konferenz publiziert. Des Weiteren wurde unser Projekt beim Feldtag „Steinbrand im Getreidebau“, organisiert von AGES und BioAustria, im Zuge eines Vortrags vorgestellt. Wir haben 2015 und 2016 am **European Tilletia Ring Test** teilgenommen, welcher rund 60 Linien an 12 unterschiedlichen Standorten, u.a. hier bei uns in Tulln auf Steinbrand und Zwergsteinbrand Resistenz, geprüft hat. In jedem Jahr haben wir potentiell resistentes **Zuchtmaterial von Züchtern im In- und Ausland** (Saatzucht Donau, Saatzucht Edelhof, Getreidezüchtung Peter Kunz, Dottenfelderhof und Getreidezüchtung Darzau) bei uns auf Steinbrand und Zwergsteinbrand Resistenz getestet. Nicht zuletzt ist zu erwähnen, dass im Rahmen von COBRA-Austria zwei **Masterarbeiten** zum Thema „Steinbrandresistenz in Winterweizen“ betreut wurden.

Die Details der wissenschaftlichen Ergebnisse dieses Projektes werden bis 2017 im Rahmen einer **Dissertation** an der BOKU und von zwei wissenschaftlichen **Publikationen** in einschlägigen Fachjournalen veröffentlicht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Projekt COBRA Austria hatte zum Ziel, Steinbrand und Zwergsteinbrand Resistenz Gene zu kartieren und damit assoziierte molekulare Marker in Winterweizen zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden 6 Kartierungspopulationen, basierend auf Kreuzungen zwischen exotischem Zuchtmaterial und anfälligen, dafür an hiesige Bedingungen angepassten Weizensorten, erstellt, welche den Resistenzquellen Blizzard, Bonneville, PI119333, M822123, PI178383 und PI560841 zuzuordnen sind und je 100-130 Linien umfassten. 2014 bis 2016 wurden diese Populationen an je einem Standort in Österreich (Tulln) auf Resistenz gegenüber gewöhnlichem Steinbrand, an drei Standorten in Österreich (Schönfeld, Tulln, und Lambach und einem Standort in den USA (Utah) auf Zwergsteinbrand Resistenz getestet. Die künstliche Inokulation mit Zwergsteinbrand an den Standorten in Österreich führte aufgrund ungünstiger Witterungsverhältnisse zu niedrigen Befallswerten, so dass keiner der Versuche erfolgreich ausgewertet werden konnte. Die künstliche Inokulation mit Zwergsteinbrand in den USA, sowie Steinbrand in Österreich lieferten in jedem der Versuchsjahre exzellenten Befallsdaten, so dass insgesamt vier Steinbrand Versuche (Tulln 2014, Tulln 2015, Tulln 2016, Glashaus Tulln 2016) und zwei Zwergsteinbrand Versuche (Utah 2015 und Utah 2016) erfolgreich ausgewertet werden konnten. Drei Kartierungspopulationen – Blizzard, Bonneville und PI119333 – wurden ausgewählt und mittels SNP Chip Technologie genotypisiert. Die gemeinsame statistische Analyse von Phänotyp und Genotyp Daten ermöglichte 1) die Bestimmung der Genomabschnitte in den Resistenzquellen Blizzard, Bonneville und PI119333, welche Resistenz gegenüber Zwergsteinbrand und Steinbrand vermitteln und 2) SNP Marker zu identifizieren, welche mit diesen „major“ QTL auf den Weizen Chromosomen 1A, 1B und 7D assoziiert sind und in der praktischen Züchtung von Steinbrand bzw. Zwergsteinbrand resistenten Sorten für den Biolandbau Anwendung finden können..

Literatur

- Chen, J. et al., 2016. A novel QTL associated with dwarf bunt resistance in Idaho 444 winter wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, pp.1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-016-2783-2>.
- Demeke, T., Laroche, A. & Gaudet, D., 1996. A DNA marker for the Bt-10 common bunt resistance gene in wheat. *Genome*, 39, pp.51–55.
- Dumalasová, V. et al., 2012. Location of genes for common bunt resistance in the European winter wheat cv. Trintella. *Euphytica*, 186(1), pp.257–264. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10681-012-0671-7> [Accessed October 22, 2014].
- Fofana, B. et al., 2007. Mapping quantitative trait loci controlling common bunt resistance in a doubled haploid population derived from the spring wheat cross RL4452 × AC Domain. *Molecular Breeding*, 21(3), pp.317–325. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11032-007-9131-9> [Accessed November 5, 2013].
- Goates, B.J., 1996. Common bunt and dwarf bunt. In R. D. Wilcoxson & E. E. Saari, eds. *Bunt and smut diseases of wheat: concepts and methods of disease management*. pp. 12–25.
- Goates, B.J. & Bockelman, H.E., 2012. Identification of New Sources of High Levels of Resistance to Dwarf Bunt and Common Bunt among Winter Wheat Landraces in the USDA-ARS National Small Grains Collection. *Crop Science*, 52(6), p.2595. Available at: <https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/52/6/2595> [Accessed May 8, 2013].
- Hoffmann, J.A. & Metzger, R.J., 1976. Current Status of virulence genes and pathogenic races of the wheat bunt fungi in then northwestern USA. *Phytopathology*, 66, pp.657–660.
- Huber, K. & Buerstmayr, H., 2006. Development of methods for bunt resistance breeding for organic farming. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 42, pp.66–71.
- Laroche, A. et al., 2000. Development of a PCR marker for rapid identification of the Bt-10 gene for common bunt resistance in wheat. *Genome*, 43(2), pp.217–223.
- Matanguihan, J. & Murphy, K., 2011. Control of Common Bunt in Organic Wheat. *Plant Disease*, 95(2), pp.92–103.
- Metzger, R.J. & Hoffmann, J.A., 1978. New races of common bunt useful to determine resistance of wheat to dwarf bunt. *Crop Science*, 18(1), pp.49–51.

Singh, A. et al., 2016. Genetic mapping of common bunt resistance and plant height QTL in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(2), pp.243–256. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-015-2624-8>.

Wang, S. et al., 2009. Markers to a common bunt resistance gene derived from “Blizzard” wheat (*Triticum aestivum* L.) and mapped to chromosome arm 1BS. *Tag Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik*, 119(3), pp.541–553. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19471904> [Accessed May 15, 2013].