

Markergestützte Selektion in der praktischen Kartoffelzüchtung - Erfahrungen und Perspektiven

Marker-assisted selection in practical potato breeding - experience and outlook

Andrea Schwarzfischer^{1*}, Anita Behn, Jennifer Groth,
Michael Reichmann, Adolf Kellermann und Ye-Su Song

Abstract

The application of marker-assisted selection is a very effective new breeding method to develop new potato varieties since genetic markers for very important breeding traits like extreme resistance to PVY and resistances to different potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* Ro1-5, *G. pallida* Pa2,3) are available. We used the markers YES-3A, YES-3B, Gro1 and HC for the evaluation of seedlings of tetraploid crossings and crossings with *Solanum phureja*. 2x and 4x plants with combined resistances were selected very efficiently. Especially ten plants with extreme resistance to PVY and resistance to *G. pallida* are highly valuable for further breeding because, until now, no German cultivar has been described carrying respective resistance combinations. Together with protoplast fusion for direct addition of selected lines with different combined resistances, marker-assisted selection offers a reliable, fast and early usable new breeding strategy for the pyramiding of important traits.

Keywords

MAS, molecular marker, pyramiding of genes, resistance breeding, *Solanum tuberosum*

Einleitung

Als die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) vor zehn Jahren mit der Genomanalyse bei Kartoffeln begann, waren zwar nur wenige genetische Marker für züchterisch bedeutende Merkmale bekannt, doch das Potential der markergestützten Selektion (MAS) als revolutionierende neue Zuchtmethodik zeichnete sich deutlich ab. Die entscheidenden Vorteile liegen in der großen Sicherheit der Selektionsergebnisse, da direkt der Genotyp untersucht wird, und in der frühzeitigen Anwendbarkeit im Sämlingsstadium. Bei Kartoffeln führt dies zu einem zeitlichen Vorsprung von mindestens 3 Jahren gegenüber klassischen Ansätzen. Insbesondere die schnelle Erfassung von Zuchtstämmen mit kombinierten (pyramidierten) Eigenschaften wird in Zukunft von großer Bedeutung sein und unter Einsparung von Feldarbeit zur schnelleren Entwicklung von hochwertigem Basiszuchtmaterial und besseren Sorten führen.

Während in den ersten Jahren die Entwicklung relevanter genetischer Marker im Vordergrund der Arbeiten an der LfL stand, sind nunmehr einige genetische Marker für züchterisch sehr bedeutende Merkmale bekannt und werden seit zwei Jahren in größerem Umfang zur MAS eingesetzt. Ergebnisse dieser Forschungsarbeiten werden im Folgenden genauer ausgeführt.

Markerentwicklung an der LfL

Die Entwicklung genetischer Marker bei Kartoffeln ist, ebenso wie die Kartoffelzüchtung selbst, nicht unproblematisch. Gründe hierfür sind die Tetraploidie und hohe Chromosomenzahl ($2n=4x=48$) dieser Fruchtart. Die erforderliche starke Heterozygotie und die vorwiegend quantitativen Vererbungsmechanismen wichtiger Eigenschaften erschweren die Arbeiten gleichermaßen. Dazu sind über 50 verschiedene Merkmale bei der Sortenentwicklung zu beachten: Knollenform, Schalenbeschaffenheit, Fleischfarbe, Stärkegehalt, Speisewert, Veredelungseignung (Chips, Pommes, Trockenkartoffel), Kaltlagerfähigkeit, Vollnertverträglichkeit, Glykoalkaloidgehalt, Ertragssicherheit sowie verschiedenste Resistenzen gegenüber Viren (PVY, PVS, PLRV, PVM, PVX, PVA), Bakterien (*Erwinia*, *Clavibacter*, *Ralstonia*, *Streptomyces*), Pilze (*Phytophthora*, *Fusarium*, Krebs), Nematoden (*Globodera*) und Insekten (Kartoffelkäfer, Läuse).

Die Markerentwicklung an der LfL konzentrierte sich zunächst auf extreme Resistenz gegen PVY und gute Chips-eignung nach 4°C-Lagerung. Über AFLP-Analysen an 57 Antherenkultur-Abkömmlingen der Y-immunen Sorte Assia gelang es, Marker für dieses monogen dominante Merkmal zu etablieren und auf Chromosom XII zu lokalisieren (SONG 2004, SONG et al. 2005). Inzwischen steht über STS-Marker (SONG und SCHWARZFISCHER 2008) ein einfaches Testsystem für die MAS auf PVY-Immunität zur Verfügung (*Abbildung 1*), das auch beim Bundessortenamt zur Charakterisierung von Sorten und Wertprüfungsstämmen eingesetzt wird. Da im süddeutschen Raum große Virusprobleme bestehen, verbunden mit hohen Aberkennungsraten in der Pflanzguttestung, ist dieses Merkmal von großer Bedeutung zur Sicherung des Kartoffelanbaus in Süddeutschland, vor allem seit Auftreten des PVY^{NTN}-Stammes, der nicht nur

¹ Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 8, 85354 Freising, Deutschland

* Ansprechpartner: Dr. Andrea SCHWARZFISCHER, andrea.schwarzfischer@LfL.bayern.de

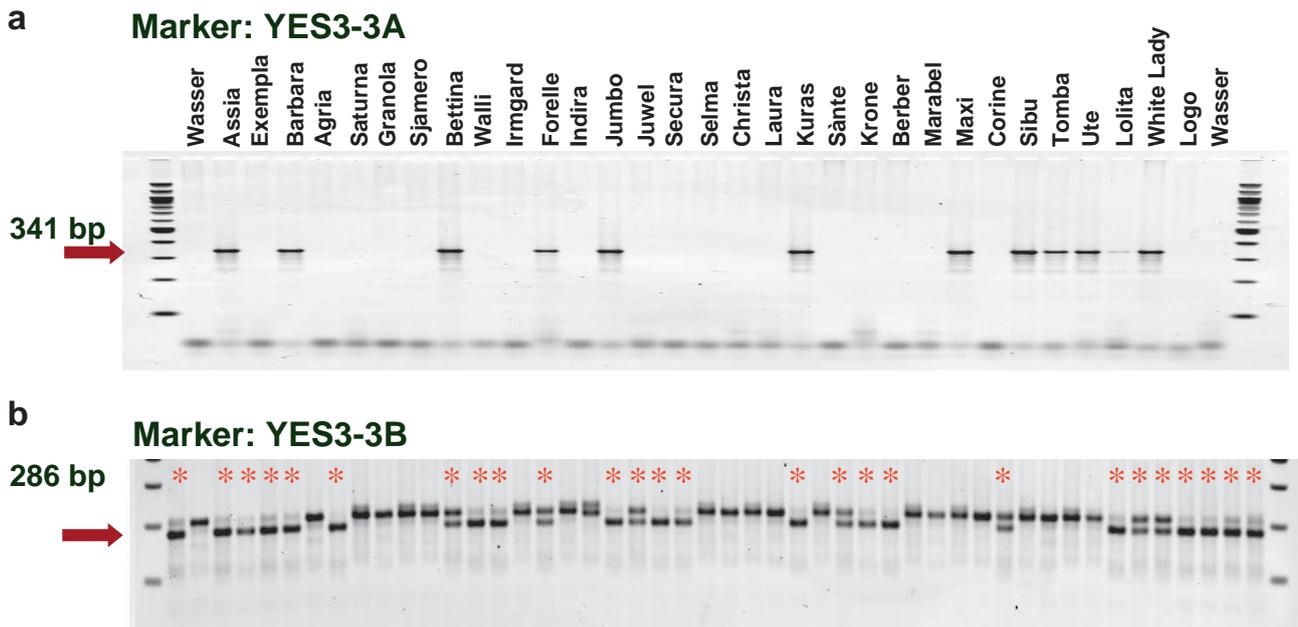


Abbildung 1: Sortenscreening (a) und Markeranalyse von Zuchtstämmen (b) mit den STS-Markern YES-3A und YES-3B auf PVY-Immunität. Mit * gekennzeichnet sind Stämme, die als resistent eingestuft wurden
 Figure 1: Screening of cultivars (a) and marker-assisted analysis of breeding lines (b) with STS markers YES-3A and YES-3B diagnostic for extreme resistance to PVY. Lines with * are breeding lines evaluated as resistant

wie andere PVY-Stämme hohe Ertragseinbußen, sondern zusätzlich Knollennekrosen hervorruft. Die QTL-Kartierung der Chipseignung ergab zahlreiche relevante Marker, die über das gesamte Genom verteilt vorliegen (SONG 2004, SONG et al. 2007). Haupt-QTLs können bisher nur begrenzt zur MAS herangezogen werden, so dass das Frittieren der Chips weiterhin als sicherere Testmethode eingesetzt wird. Neben der Etablierung von Markern gegen *Globodera rostochiensis* Ro2,3,5 (SONG und SCHWARZFISCHER 2007) und *G. pallida* Pa3 konzentrieren sich unsere Arbeiten derzeit auf die Entwicklung von Krebsresistenzmarkern. Erste Markerkandidaten liegen vor.

Anwendbarkeit publizierter Marker

In den letzten Jahren wurden zwei sehr bedeutende Nematoden-Resistenzmarker am Max-Planck Institut in Köln entwickelt. Die Kartoffelnematoden verursachen Ertragsminderungen von über 50% in Befallsgebieten. Insbesondere Durchwuchs in Kartoffelanbaugebieten mit enger Fruchtfolge wie im Donaumoos fördert die Nematodenvermehrung. Auf Befallsflächen können nur noch resistente Sorten angebaut werden. Gerade im Speisebereich sind fast keine resistenten Sorten beschrieben. Der SNP-Marker Gro1 (BARONE et al. 1990, PAAL et al. 2004, GEBHARDT et al. 2006) selektiert nicht nur die Resistenz gegen den Pa-

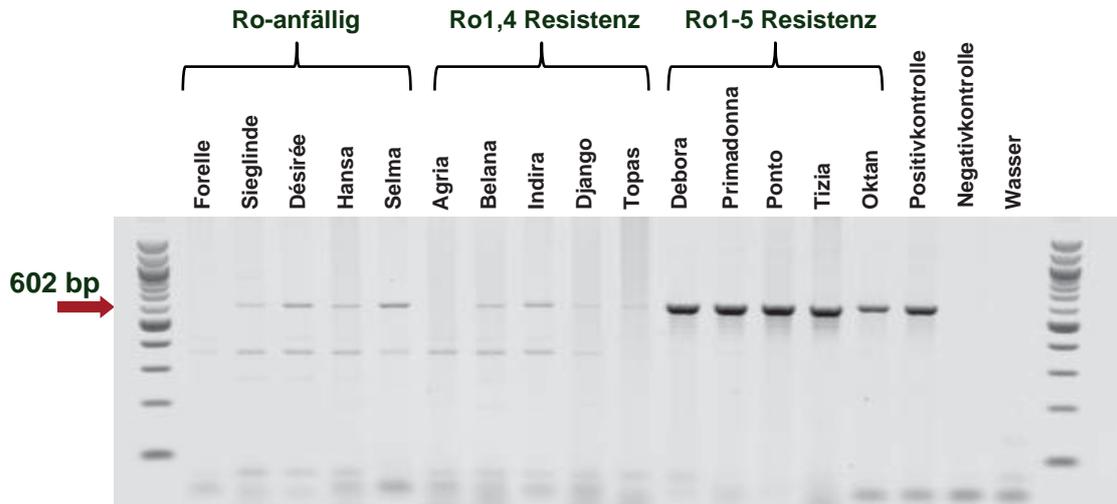


Abbildung 2: Sortenanalyse mit dem Marker Gro 1
 Figure 2: Screening of cultivars applying the marker Gro 1

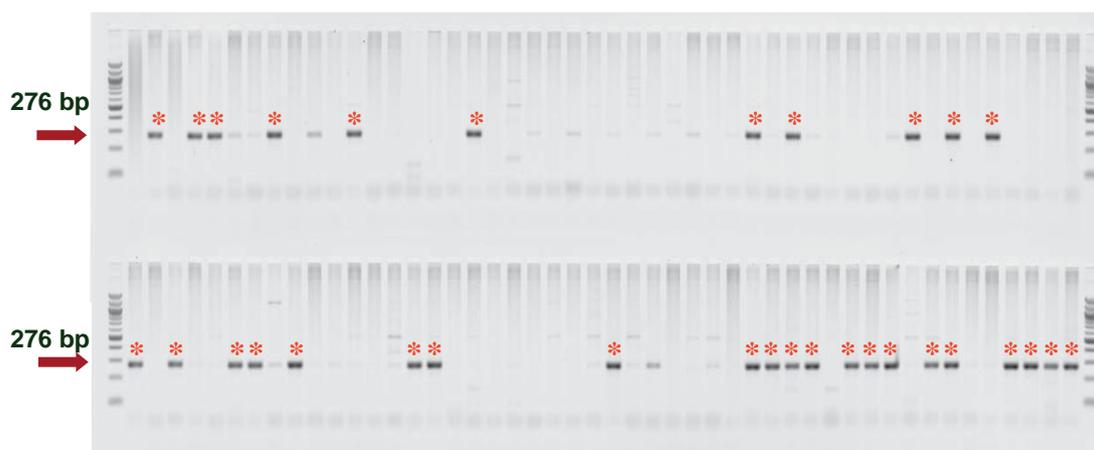


Abbildung 3: Markeranalyse von Zuchtstämmen mit dem Marker HC auf *Globodera pallida* Pa3-Resistenz. Mit * gekennzeichnet sind Stämme, die als resistent eingestuft wurden.

Figure 3: Marker-assisted analysis of breeding lines tagged with the marker HC diagnostic for resistance to *Globodera pallida* Pa3. Lines with * are breeding lines evaluated as resistant.

thotypen Ro1 oder, wie angedeutet, eine breite Resistenz gegenüber Ro1-4 sondern diagnostiziert in idealer Weise Sorten mit Ro1-5 Vollresistenz (Abbildung 2). Von den 200 deutschen Kartoffelsorten weisen bisher nur 16 Sorten diese Vollresistenz auf.

Seit kurzem ist auch der SNP-Marker HC (SATTARZADEH et al. 2006) zur Selektion der sehr bedeutenden Pa3-Resistenz bei uns im Einsatz. Abbildung 3 zeigt eine Analyse verschiedener Kreuzungsnachkommen eines resistenten Zuchtstammes der LfL.

Analyse von tetraploiden Sämlingen über MAS

Im Jahr 2008 wurden 2581 Sämlinge von 16 verschiedenen Kreuzungen mit einem PVY-immunen Elterstamm über MAS evaluiert. Bei 10 dieser Kreuzungen wies ein Kreuzungspartner zudem eine Ro1-5 Resistenz auf, so dass insbesondere auf Nachkommen mit kombinierten Resistenzen selektiert werden konnte. Diese sind aus züchterischer Sicht

extrem wertvoll, da von den 200 deutschen Sorten bisher nur 4 diese beiden Resistenzen in Kombination aufweisen. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Insgesamt reagierten die Proben von 1251 Sämlingen (48,5%) positiv hinsichtlich des PVY Immunität-Markers, bei 821 Sämlingen (50%) zeigte der Gro1-Marker eine positive Reaktion und bei 394 Pflanzen (24%) ist auf Grund der Ergebnisse von kombinierten Resistenzen auszugehen. Ihr züchterischer Wert wird nun anhand der Feldergebnisse weiter evaluiert. Bei beiden Merkmalen liegt eine 1:1 Spaltung vor. Damit wird auch die Ro1-5 Resistenz vermutlich monogen dominant vererbt.

Analyse von primärdihaploiden Sämlingen

Zur Vereinfachung der Kartoffelzüchtung werden seit über 30 Jahren an der LfL Kreuzungen mit der Wildart *Solanum phureja* als Pollenspender durchgeführt. Dabei entstehen zu ca. 8% Samen mit diploiden Embryonen, die

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse der MAS 2008 an tetraploiden Sämlingen

Table 1: Summary of the results of the marker-assisted selection in 2008 with tetraploid seedlings

Kreuzung	Anzahl Sämlinge	PVY immun	PVY anfällig	Ro1-5 resistent	Ro1-5 anfällig	PVY+Ro1-5 resistent	PVY + Ro1-5 anfällig
598	192	90	102	131	61	57	28
601	91	52	39	51	40	27	15
603	192	93	99	98	94	45	46
605	26	8	18	19	7	6	5
793	308	149	159	147	161	71	83
794	235	113	122	98	137	43	67
795	107	54	53	52	55	26	27
797	122	58	64	59	63	32	37
798	237	113	129	105	132	53	71
799	134	76	54	61	69	34	29
791	210	111	99				
850	251	117	134				
877	126	65	57				
897	111	44	61				
940	114	52	56				
941	125	56	69				
Summe	2581	1251	1315	821	819	394	408

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der MAS 2009 an primärdihaploiden Sämlingen

Table 2: Summary of the results of the marker-assisted selection in 2009 with primary dihaploid seedlings

Kreuzung	Anzahl Sämlinge	PVY immun	PVY anfällig	Ro1-5 resistent	Ro1-5 anfällig	Pa3 resistent	Pa3 anfällig	PVY+Ro1-5 resistent	PVY+Pa3 anfällig
3154	10	3	7	7	3			2	
3162	53	19	34	37	16			13	
3150	49	13	36			12	37		6
3155	47	17	30			23	24		4
3152	151	55	96						
3157	107	55	52						
3159	12	9	3						
3160	92	43	49						
3161	39	16	23						
3165	44	21	23						
3166	88	37	51						
3169	69	17	52						
3171	69	30	39						
3147	23			16	7				
3153	2			2					
3168	21			6	15				
3156	43					16	27		
3158	49					28	21		
Summe	968	335	495	68	41	79	109	15	10

fast ausschließlich das Erbgut der Mutter aufweisen. Die Samen werden *in vitro* angezogen. Von den Sämlingen wird dann über Flow Cytometrie die Ploidie ermittelt. Diploide Pflanzen werden vermehrt und im Gewächshaus zur Knollenproduktion angebaut. Mit 968 dieser Pflanzen wurde im Jahr 2009 eine MAS durchgeführt. Analysiert wurden 18 Kreuzungsnachkommenschaften, 13 mit PVY Immunität, 5 mit Ro1-5 Resistenz und 4 mit Pa3 Resistenz. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist *Tabelle 2* zu entnehmen. Von 830 Pflanzen reagierten 335 (40%) positiv auf den PVY-Marker, bei 68 (62%) von 109 Pflanzen ist von Ro1-5 Resistenz auszugehen und 79 (42%) von 188 Sämlingen reagierten positiv auf den HC Marker für Pa3-Resistenz. Die Daten weichen etwas von den erwarteten 1:1 Spaltungen ab. Es ist noch zu prüfen, ob dies zufallsbedingt oder durch die spezielle Kreuzungsart hervorgerufen wird, da sich die Beobachtung auch bei fast allen Einzelkreuzungen nachvollziehen lässt. Die Ergebnisse des HC-Markers lassen auf die dominante Vererbung eines Hauptgenes für Pa3-Resistenz schließen. Von besonderer Bedeutung sind auch bei diesen Kreuzungsnachkommen die Pflanzen mit kombinierten Resistenzen. Von einzigartigem Wert sind die 10 Zuchtstämme mit kombinierter PVY Immunität und Pa3-Resistenz, da bisher keine Sorten mit diesen Resistenzkombinationen beschrieben sind.

Pyramidierung über Protoplastenfusion

Bei der Protoplastenfusion werden von zwei verschiedenen Ausgangsstämmen zellwandlose Einzelzellen (Protoplasten) isoliert und elektrisch miteinander verschmolzen (SCHWARZFISCHER et al. 2002). So können nun diese mehrfach resistenten Linien mit PVY-Immunität und Pa3 Resistenz mit Ro1-5 resistenten Fusionspartnern kombiniert werden. Die resultierenden tetraploiden somatischen Fusionshybride werden nach bisherigen Erfahrungen auf Grund der additiven Vererbung bei der Zellfusion alle Resistenzen ausprägen. Die Protoplastenfusion ist somit eine

ideale Ergänzung zur MAS zur schnellen und gezielten Pyramidierung wertvoller Eigenschaften.

Zusammenfassung und Ausblick

Der Einsatz der MAS in der Kartoffelzüchtung erweist sich bisher als äußerst hilfreich zur schnellen Selektion von Kreuzungsnachkommen mit kombinierten Resistenzeigenschaften. Die Methode lässt sich gut bereits an kleinen Sämlingspflanzen einsetzen und ist nach bisherigen Erfahrungen als äußerst zuverlässig einzustufen. Mittlerweile liegen erforderliche Marker für züchterisch sehr bedeutende Merkmale vor, so dass auch der hohe Kostenaufwand, der leider immer noch mit der MAS verbunden ist, lohnenswert erscheint, vor allem wenn kombinierte Resistenzen zu erwarten sind. Pflanzen mit völlig neuen Resistenzkombinationen, die bisher nicht im deutschen Sortenspektrum beschrieben sind, konnten über MAS ermittelt werden. Aktuelles Ziel ist die Vereinfachung der Probenaufarbeitung bis hin zur direkten PCR aus Pflanzengewebe mit Hilfe eines sehr empfindlichen Detektionssystems (z.B. Phire-Taq) und die Etablierung eines multiplexen PCR-Ansatzes, bei dem mehrere Merkmale in einer Reaktion erfasst werden können. Damit wird eine erhebliche Reduzierung der Kosten möglich. Wir gehen davon aus, dass in Zukunft nur noch mit ca. 15 Cent/Probe kalkuliert werden muss. Damit wird die MAS nicht nur zu einem sicheren und schnellen Selektionssystem in frühen Generationen, sondern auch zu einer wirtschaftlich interessanten neuen Zuchtmethodik, die zu einem gewinnbringenden Züchtungsfortschritt beitragen wird.

Literatur

- BARONE A, RITTER E, SCHACHSCHABEL U, DEBENER T, SALAMINI F, GEBHARDT C, 1990: Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Mol Gen Genet 224, 177-182.

- GEBHARDT C, BELLIN D, HENSELEWSKI H, LEHMANN W, SCHWARZFISCHER J, VALKONEN JPT, 2006: Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor Appl Genet* 112, 1458-1464.
- PAAL J, HENSELEWSKI H, MUTH J, MEKSEM K, MENÉNDEZ CM, SALAMINI F, BALLVORA A, GEBHARDT C, 2004: Molecular cloning of the *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostchiensis*, based on a candidate gene approach. *Plant J* 38, 285-297.
- SATTARZADEH A, ACHENBACH U, LÜBECK J, STRAHWALD J, TACKE E, HOFFERBERT HR, ROTHSTEYN T, GEBHARDT C, 2006: Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping as basis for developing a PCR-based marker highly diagnostic for potato varieties with high resistance to *Globodera pallida* pathotype Pa2/3. *Mol Breed* 18, 301-312.
- SCHWARZFISCHER A, SONG YS, SCHOLZ H, Schwarzfischer J, HEPTING L, 2002: Haploidiezüchtung, Protoplastenfusion und Entwicklung von genetischen Markern zur gezielten Sortenentwicklung bei Kartoffeln. *Votr Pflanzzüchtg* 54, 123-130.
- SONG YS, 2004: Genetic marker analysis in potato for extreme resistance (Ry_{sto}) to PVY and for chip quality after long term storage at 4°C. Dissertation, Technische Universität Freising-Weihenstephan.
- SONG YS, SCHWARZFISCHER A, 2007: Marker development of potato nematode resistance to *G. rostochiensis* pathogen Ro2/3 and Ro5. In: Bericht über die 57. Tagung 2006 der Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute, p 120. HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Irdning, Austria.
- SONG YS, SCHWARZFISCHER A, 2008: Development of STS markers for selection of extreme resistance (Ry_{sto}) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. *Am J Pot Res* 85, 159-170.
- SONG YS, MIKOLAJEWSKI S, SCHWARZFISCHER A, 2007: cDNA-AFLP analysis for potato chip color quality after long term storage at 4°C. In: Bericht über die 57. Tagung 2006 der Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute, p 121. HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Irdning, Austria.
- SONG YS, HEPTING L, SCHWEIZER G, HARTL L, WENZEL G, SCHWARZFISCHER A, 2005: Mapping of extreme resistance to PVY (Ry_{sto}) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines. *Theor Appl Genet* 111, 879-887.