

Molekulare Marker in der praktischen Weizenzüchtung bei RAGT

Use of molecular markers in the wheat breeding programme of RAGT

Hilmar Cöster^{1*}

Abstract

Wheat breeding at RAGT is routinely using molecular markers. Breeding for resistance to Fusarium head blight (FHB) is shown as an example for marker application. Four populations from parents of the European gene pool were developed for QTL discovery. The dwarfing gene *Rht-D1b* (*Rht2*) was the most important QTL for Fusarium susceptibility. R^2 of nearly all other QTLs was below 10%. Implications for breeding are discussed. Exotic new sources of FHB resistance were backcrossed into adapted varieties. Some of these can increase the resistance level of susceptible varieties significantly. QTL discovery is in development. Resistance to soil borne mosaic viruses is shown as another example. Markers were developed through bulk segregant analysis of advanced lines of known resistance. The discovered marker has been routinely used over many years. It has replaced the conventional pathology assay. Marker application in pre-breeding and in the normal breeding process is also described.

Keywords

Cereal virus diseases, Fusarium head blight, QTL, *Triticum aestivum*

Einleitung

Das Weizenprogramm von RAGT geht ursprünglich auf die Züchtung des Plant Breeding Institutes (PBI) der Universität Cambridge zurück. 1987 wurde es privatisiert und an Unilever verkauft. 1998 übernahm Monsanto das Zuchtprogramm. Es wurde in Markertechnologie investiert und eine genetische Karte des Weizens mit ca. 2000 Mikrosatelliten (SSR) Markern entwickelt. 50% der Marker sind aus der öffentlichen Forschung, 50% selbst entwickelt. Im Jahr 2004 ging die Getreidezüchtung an RAGT, eine französische Saatgut- und Agrarhandelsfirma. Es werden

weiterhin Marker entwickelt und als Routineanwendung in der Züchtung eingesetzt.

Resistenzzüchtung gegenüber Ährenfusarium (*Fusarium* spp.)

Anfang der 1990-iger Jahre erwiesen sich kurzstrohige hochertragreiche Winterweizensorten als sehr anfällig gegenüber Ährenfusarium. Eine Verbesserung der Resistenz war dringend nötig. Neben den grundsätzlichen Überlegungen der Kreuzungsauswahl, des erstrebten Sortentyps, usw. stellte sich die Frage der Selektionsstrategie.

Markergestützte Selektion (MAS)

Die konventionelle Feldselektion sollte durch markergestützte Selektion ergänzt werden. Dazu wurden 4 QTL Kartierungspopulationen entwickelt (Tabelle 1).

Die Eltern der ersten Population haben beide das Verzweigungsgen *Rht-D1b* (*Rht2*). Unabhängig von der Pflanzenhöhe sollten Resistenz QTLs gefunden werden. Enttäuschenderweise ergab die Analyse keine QTLs mit einem Bestimmtheitsmaß $R^2 > 10\%$. Effekte einzelner QTLs konnten zwar in anderen Kreuzungen nachgewiesen werden, waren aber sehr klein.

Die Eltern der Population Centrum \times Macro zeigen große Unterschiede in der Resistenz gegenüber Fusarium und der Pflanzenhöhe. Centrum hat kein bekanntes *Rht* Gen, Macro *Rht2*. Dieses Verzweigungsgen erhöht die Anfälligkeit (20% der erklärten phänotypischen Varianz). Außerdem konnte ein weiterer QTL mit $R^2 = 18\%$ gefunden werden, der sich auch im Zuchtmaterial an anderen Kreuzungen mit Centrum bestätigen ließ.

Die Population Romanus \times Pirat wurde im Rahmen eines GFP-Projektes untersucht. Auch hier hatte das *Rht2* Gen den größten Effekt. Weitere entdeckte QTL waren mit $R^2 < 10\%$ relativ klein (GFP-Projekt Verringerung des Mykotoxingehaltes von Weizen bei Befall mit Ährenfusariosen)

Tabelle 1: QTL Kartierungspopulationen für Resistenz gegen Ährenfusarium (FHB)

Table 1: QTL mapping populations for Fusarium head blight (FHB) resistance, FHB resistance score of parental genotypes in parentheses (1, resistant; 9, very susceptible), number of test environments and R^2 of dwarfing genes and resistance QTLs

Kreuzung / Fusarium Resistenz (APS)	<i>Rht</i> Gen	Prüfumwelten	R^2 <i>Rht</i> Gene (%)	R^2 der größten QTLs (%)
Kris (7) \times Corvus (4)	<i>Rht2</i> / <i>Rht2</i>	8	-	10, 9, 8
Centrum (2) \times Macro (8)	- / <i>Rht2</i>	3	20	18, 7, 6, 6
Romanus (2) \times Pirat (7)	- / <i>Rht2</i>	5	28	8
Cliff (6) \times Hermann (3)	<i>Rht2</i> / <i>Rht1</i>	4	26	8, 8, 6

¹ RAGT 2n, Steinesche 5A, D-38855 SILSTEDT

* Ansprechpartner: Hilmar CÖSTER, hcoester@ragt.fr

durch zuchtmethodische Verfahren, VOSS et al. 2008, HOLZAPFEL et al. 2008).

Die Population Cliff × Hermann weist zwei verschiedene *Rht* Gene auf, nämlich *Rht-D1b* (*Rht2*) und *Rht-B1b* (*Rht1*). Beide Verzweigungsgene erklären den größten Teil der Varianz im Durchschnitt von $R^2 = 28\%$. Auch hier bleiben die weiteren QTLs relativ klein.

Welche Schlussfolgerungen können daraus für die Züchtung gezogen werden? Die Verzweigungsgene haben im untersuchten europäischen Formenkreis den größten Effekt auf die Fusariumanfälligkeit. Die Züchtung hat folgende Optionen: (1) Verzicht auf *Rht1* und *Rht2*, um die Fusariumresistenz zu erhöhen; (2) Nutzung anderer Verzweigungsgene oder (3) kurze Sorten mit *Rht1* oder *Rht2* mit quantitativen Resistenzen anreichern, um negative Effekte auszugleichen.

Introgression exotischer Resistenzquellen

Die Resistenz von Sumai 3 ist in der Literatur mehrfach beschrieben und bestätigt worden (BÜRSTMAYR et al. 2009). Auch im Zuchtmaterial konnten nach mehrfacher Rückkreuzung Linien mit deutlich verbesserter Resistenz gefunden werden (Sumai QTLs auf 3B und 5A). Bei RAGT wurden im Rahmen der Vorzüchtung (prebreeding) eine größere Anzahl exotischer Resistenzquellen von CIMMYT und anderen Institutionen bearbeitet. Nach umfangreichen Resistenzprüfungen wurden Rückkreuzungen mit anfälligen adaptierten Winterweizensorten durchgeführt. Eine Auswahl der nach verschiedenen Selektionsschritten erhaltenen besten Resistenzquellen und besten Rückkreuzungslinien ist in *Tabelle 2* dargestellt. Die angeführten Linien sind als Winterform mit ähnlichem Datum für das Ährenschieben gut mit den rekurrenten Eltern vergleichbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, solche Resistenzen in hiesiges adaptiertes Material zu übertragen. Trotz der Rückkreuzung mit sehr anfälligen Eltern kann das Ni-

veau von resistenten Sorten wie Esket und Centrum erreicht werden. QTL Analysen werden momentan durchgeführt.

Feldselektion von Kreuzungen europäischer Winterweizen

Durch entsprechende Kreuzungsplanung und konsequente Feldselektion konnte die Anfälligkeit der eigenen zugelassenen Sorten von hoch bis sehr hoch (APS 8) auf gering (APS 3) reduziert werden. Die Ausprägungsstufen (APS) werden vom deutschen Bundessortenamt nach umfangreichen Prüfungen durch das Julius-Kühn Institut (Dr. Rode mann) festgesetzt (bis 2002 Fusarium Sprühinfektion, ab 2002 Fusariuminfektion nach der Maisstoppelmethode). *Abbildung 1* zeigt die Sorten der Zulassungsjahre 1996 bis 2008 aus dem deutschen Zuchtprogramm (PBI, Monsanto, RAGT). Diese Aufstellung beschränkt sich nur auf eine Auswahl von Sorten mit dem Verzweigungsgen *Rht2*. Das heißt, die anfälligeren kurzen Sorten konnten durch die Anreicherung von positiv wirkenden Resistenzgenen deutlich verbessert werden.

Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die konventionelle Züchtung mit sorgfältig durchgeführten Feldprüfungen nach wie vor eine wesentliche Säule der Sortenentwicklung bleibt. Die oben genannten Markeranalysen haben aber neue Erkenntnisse über die Wirkung der Verzweigungsgene auf die Fusariumanfälligkeit gebracht. Inwieweit Marker für kleinere QTLs in der Züchtung genutzt werden sollten, sei dahingestellt. Für die Einlagerung von neuen Resistenzquellen sind die Marker jedoch eine wesentliche Hilfe. Erfahrungsgemäß bringt hier die markergestützte Selektion in Verbindung mit der Resistenzprüfung auf dem Feld die besten Ergebnisse (siehe auch MIEDANER et al. 2008). Die nächsten Jahre werden zeigen, ob es gelingt, neue exotische Resistenzen in Sorten einzulagern und damit der Landwirtschaft nutzbar zu machen.

Tabelle 2: Rückgekreuzte Resistenzquellen im Vergleich zu den rekurrenten Eltern. Ergebnisse aus der Sprühinfektion mit *Fusarium culmorum*, Silstedt (FHB, Mittel aus 3 Fusarium-Bonituren; DTAE, Datum Ährenschieben; jeweils 2 Versuchswiederholungen)

Table 2: Fusarium head blight resistance of backcross resistance sources with exotic resistance sources in comparison to their recurrent parent. Results from field experiments (2 replications) in Silstedt with artificial inoculation with *F. culmorum* (FHB, mean of 3 scoring dates; DTAE, date of heading (DDMM))

Rückgekreuzte Resistenzquellen im Vergleich zu den rekurrenten Eltern	2007 FHB	2008 DTAE	2008 FHB	2009 DTAE	2009 FHB
Clarus	5,7	03/06	4,7	02/06	4,7
Linie 1 (Resistenz A / Clarus BC1)	4,0	03/06	1,5	25/05	2,3
Linie 2 (Resistenz A / Clarus BC1)	3,8	02/06	1,8	31/05	2,8
Macro	6,3	02/06	5,2	27/05	8,0
Linie 3 (Resistenz B / Macro BC1)	4,8	01/06	2,5	26/05	3,3
Opus	5,3	04/06	4,7	01/06	6,7
Linie 4 (Resistenz B / Opus BC1)				27/05	2,8
Macro	6,0	01/06	6,7	27/05	7,8
Linie 5 (Resistenz C / Macro BC1)	4,0	01/06	1,8	28/05	2,5
Candidat	5,8	03/06	4,5	30/05	7,0
Linie 6 (Resistenz C / Candidat BC1)				27/05	4,7
Esket	2,8	03/06	1,8	01/06	2,7
Centrum	2,9	02/06	1,7		

Resistenzzüchtung gegenüber bodenbürtigen Viren

Bodenbürtige Viren (SBCMV, *soil borne cereal mosaic virus*; WSSMV, *wheat spindle streak mosaic virus*) sind besonders in Frankreich ein bedeutender Schädling, breiten sich aber auch in Deutschland und Großbritannien aus. Sie werden von einem Bodenpilz (*Polymyxa graminis*) übertragen. Die einzige Lösung zur Bekämpfung sind resistente Weizensorten. Die Resistenzprüfung im Feld ist nicht ganz einfach, da man ein gleichmäßig verseuchtes Feld braucht und spaltende Generationen schwierig zu beurteilen sind.

Im französischen Zuchtprogramm von RAGT (Christophe Michelet, Yann Manes) stellte sich deshalb vor mehr als 10 Jahren die Frage nach markergestützter Selektion. Zunächst konnten anhand vorhandener Daten eine einfache auf einem Gen beruhende Vererbung vermutet und Resistenzträger identifiziert werden. Dann wurde an Zuchtstämmen mit bekanntem Resistenzstatus und an resistenten und anfälligen Ramschen aus denselben Kreuzungen bzw. Nachkommenschaften eine sogenannte *Bulk Segregant Analysis* durchgeführt. Nach einem Screening von ca. 1600 Markern gelang es, Marker Kandidaten zu identifizieren. Diese wurden dann an 400 Zuchtstämmen validiert und eine Kartierungspopulation erstellt. Das Ergebnis ist in *Abbildung 2* zu sehen. Der Marker für die identifizierte *Sbm1* Resistenz wird seit Jahren routinemäßig angewandt und ersetzt die konventionelle Feldprüfung des jungen Zuchtmaterials (siehe auch PEROVIC et al. 2008).

Dieses Beispiel zeigt, dass die Anwendung der markergestützten Selektion eine deutliche Verbesserung und Vereinfachung der Selektion ermöglicht.

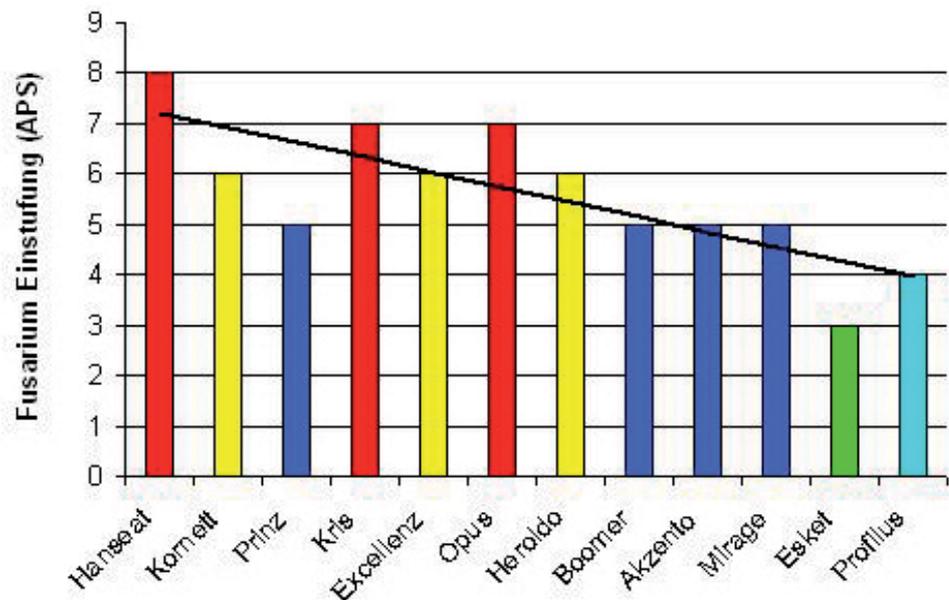


Abbildung 1: Kurzstrohige Sorten und deren Anfälligkeit gegenüber *Fusarium ssp.* aus den deutschen Sortenzulassungen der Jahre 1996 bis 2008

Figure 1: Semi-dwarf winter wheat varieties released in Germany in the years 1996 to 2008 and their susceptibility against *Fusarium* head blight

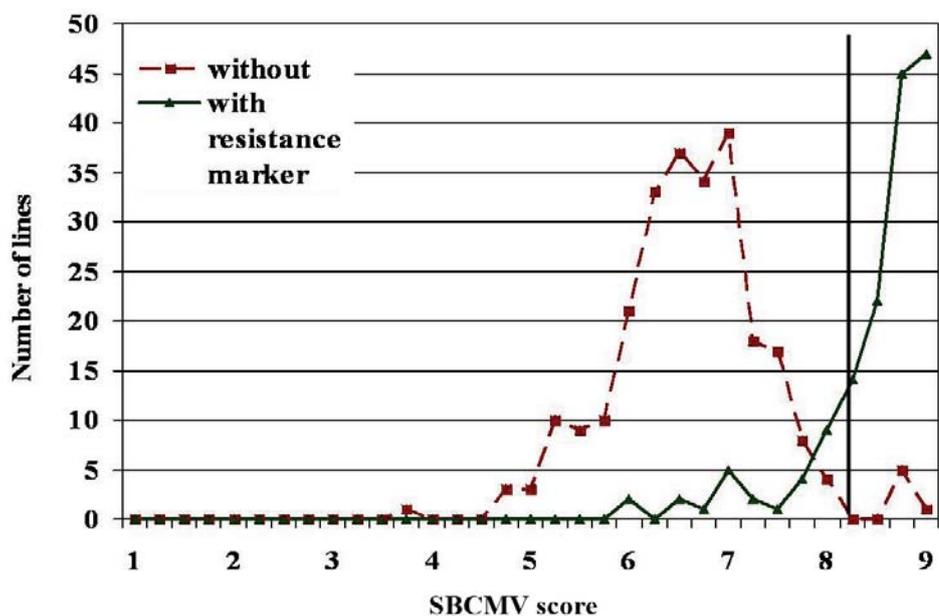


Abbildung 2: Anzahl an F6/F7-Linien des französischen Weizenzüchtungsprogramms (1998/1999) mit den entsprechenden SBCMV Bonituren (1, anfällig; 9, resistent) mit oder ohne markerdetektierter Resistenz

Figure 2: Number of F6/F7 lines from the French wheat breeding programme (1998/1999) and their susceptibility to SBCMV (1, susceptible; 9, resistant) developed with or without resistance marker

Validierung von molekularen Markern

Ehe molekulare Marker in der praktischen Züchtung angewendet werden können, müssen nach der Entdeckung der QTLs noch wesentliche Arbeiten zur Validierung erledigt werden, die hier nur stichwortartig erwähnt wer-

den sollen: Feinkartierung, Prüfung der Übertragbarkeit auf anderes Material (andere Populationen, unselektierte Züchtungsgenerationen), allelischer Effekt (Wie sieht der Vergleich des entdeckten QTLs zu anderen Allelen aus, die nicht in der Kartierungspopulation geprüft wurden?) und NIL (Möglichkeit der Überprüfung der Wirksamkeit an nahisogenen Linien)

Anwendung von molekularen Markern

Bei der züchterischen Verwendung von neuen Eigenschaften oder Resistenzgenen leistet die Markertechnologie einen wesentlichen Beitrag. Neue Gene können besser lokalisiert und charakterisiert werden. Es ist möglich, die Introgression gezielter einzulagern und das Fragment zu verkleinern. Rückkreuzungsschritte bis zur Sortenentwicklung können zügig durchgeführt werden.

Im Züchtungsprozess können molekulare Marker angewendet werden zum Screening und der Auswahl von Kreuzungseltern (Identifikation von wichtigen Genen, z.B. *Rht* Gene, Resistenzen, etc.), der Selektion der F1 von 3-Wege-Kreuzungen, MAS in jungen Generationen (Hier sind einige konkrete Fragen zu stellen: Welche Eigenschaften? Bringt die MAS im Vergleich zur Feldselektion Vorteile? Welche Marker sind vorhanden? In welcher Generation soll selektiert werden?), der Analyse fortgeschrittener Zuchtlinien und der Erhaltungszüchtung und Sortenreinheit.

Grundsätzlich stellt sich bei der praktischen Anwendung die Frage, ob die QTL Entwicklung nicht oft zu spät kommt, also nur analysiert und beschreibt, was schon bereits in der Züchtung gemacht wurde. Zum Beispiel sind Kreuzungen mit interessanten Eltern aus dem Zuchtprogramm nach der QTL Analyse bereits in fortgeschrittenen Generationen, sodass es keinen Sinn ergibt, an diesen die MAS noch anzuwenden. Zur sinnvollen Anwendung gehört die Interaktion zwischen Züchtern und Markerexperten, um die Markerentwicklung und -anwendung dynamisch fortzuentwickeln.

Ausblick

Die Entwicklung von neuen Markern ist ein sehr kostenintensiver Prozess, der von den privaten Züchtern allein nicht zu bewältigen ist. Besonders bei der Nutzbarmachung von neuen Resistenzen und speziellen Eigenschaften im Bereich der Vorzüchtung (Prebreeding) und der damit verbundenen

Markerarbeit ist die öffentliche Forschung gefragt. Aber auch große Themen, wie das der Markerentwicklung für die Ertragszüchtung, können von einzelnen Züchtungsfirmen nicht alleine bearbeitet werden. Umgekehrt wird die Forschung von den Anregungen und Fragestellungen der Züchtung stimuliert und kann gegebenenfalls auf Züchtungsmaterial zurückgreifen. Eine enge Kooperation geschieht deshalb im gegenseitigen Nutzen.

Die Anwendung von Markern im praktischen Zuchtbetrieb, muss wie an den Beispielen aufgezeigt differenziert betrachtet werden. So bleibt es jeder Züchterin, jedem Züchter selbst überlassen, je nach vorhandenen Ressourcen zu entscheiden, ob, wie und in welchem Umfang Marker eingesetzt werden sollen.

Danksagung

Markerteam in Cambridge, jetzt Ickleton: Dr. Peter Jack, Chris James. Weizenzüchtungsteam in Silstedt: Andreas Fürste, Uta Liesenberg. RAGT Getreide Züchtungsteams in Ickleton (GB), Louville la Chenard (F) und Branisovice (CZ). GFP Fusarium Projektgruppe.

Literatur

- BÜRSTMAYR H, BAN T, ANDERSON JA, 2009: QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding* 128, 1-26.
- HOLZAPFEL J, VOSS HH, MIEDANER T, KORZUN V, HÄBERLE J, SCHWEIZER G, MOHLER V, ZIMMERMANN G, HARTLL, 2008: Inheritance of resistance to Fusarium head blight in three European winter wheat populations. *Theor Appl Genet* 117, 1119-1128.
- MIEDANER T, WILDE F, KORZUN V, EBMEYER E, 2008: Phenotypic selection for high resistance to Fusarium head blight after introgression of quantitative trait loci (QTL) from exotic spring wheat and verification by simple sequence repeat markers a posteriori. *Plant Breeding* 127, 217-221.
- PEROVIC D, FÖRSTER J, DEVAUX P, HARIRI D, GUILLEROUX M, KANYUKA K, LYONS R, WEYEN J, FEUERHELM D, KASTIRR U, SOURDILLE P, RÖDER M, ORDON F, 2009: Mapping and diagnostic marker development for *Soil-borne cereal mosaic virus* resistance in bread wheat. *Mol Breed* 23, 641-653.
- VOSS HH, HOLZAPFEL J, HARTL L, KORZUN V, RABENSTEIN F, EBMEYER E, CÖSTER H, KEMPF H, MIEDANER T, 2008: Effect of the *Rht-D1* dwarfing locus on Fusarium head blight rating in three segregating populations of winter wheat. *Plant Breeding* 127, 333-339.