

Pyramiding von Resistenzgenen gegen das Zucchini Gelbmosaikvirus in Ölkürbis (*Cucurbita pepo*)

Martin Pachner^{1*} und Tamas Lelley¹

Abstract

A catastrophic virus epidemic in 1997 led to considerable crop failure in Styrian oil pumpkin (*Cucurbita pepo*) which possessed no resistance to the Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV). The aim of the here described work was, to combine several resistances against the virus in the Austrian oil pumpkin breeding material. At the beginning we used American zucchini varieties containing resistance genes from the *C. moschata* landrace Nigerian Local. Later an Israeli zucchini breeding line, the resistance of which originated from the *C. moschata* landrace Menina, Portugal, was also used. In the meantime, through crossing experiments, we identified five different resistance genes against ZYMV in the species *C. moschata*. Later, we transferred all these *C. moschata* resistances into oil pumpkin. After having generated oil pumpkin lines for each resistance and developed molecular markers (RAPD, SCAR and SSR) for three of the resistance genes, in a „Pyramiding“ programme, we brought together four resistance genes in one oil pumpkin genotype.

Key words: ZYMV, RAPD, SCAR, SSR, *Cucurbita moschata*

Zusammenfassung

Eine katastrophale Virusepidemie im Jahr 1997 hat im steirischen Ölkürbis (*Cucurbita pepo*), der keine Resistenz gegen das Zucchini Gelbmosaikvirus (ZYMV) besaß, zu erheblichen Ernteaufschlägen geführt. Ziel des hier beschriebenen Vorhabens war, mehrere Resistenzen gegen das Virus im österreichischen Ölkürbiszuchtmaterial zusammenzuführen. Am Beginn unserer Arbeiten verwendeten wir amerikanische Zuchinisorten, die Resistenzgene aus der nigerianischen Landsorte Nigerian Local (*Cucurbita moschata*) besaßen. Später kam eine israelische Zucchini Linie hinzu, deren Resistenz auf die *C. moschata* Landrasse Menina, aus Portugal, zurückgeht. In der Zwischenzeit identifizierten wir, in umfangreichen Untersuchungen, in der Art *C. moschata* fünf verschiedene Resistenzgene gegen ZYMV.

Anschließend übertrugen wir alle diese Resistenzen, durch Brückenkreuzungen mit Zucchini, in Ölkürbis. Nachdem wir für jede Resistenz Ölkürbis-Linien erzeugten und für drei der Resistenzgene molekulare Marker (RAPD, SCAR und SSR) entwickeln konnten, gelang es uns in einem „Pyramiding“-Programm vier Resistenzgene in einen Ölkürbis-Genotyp zusammenzuführen.

Einleitung

Im Jahr 1997 verursachte das Zucchini Gelbmosaikvirus (ZYMV) in Österreich Ernteaufschlägen bis zu 50%. Die Epidemie zeigte, dass die österreichischen Ölkürbissorten keine genetisch bedingte Resistenz gegen das Virus besaßen. Jedoch war genetisch bedingte Virusresistenz in der Art *Cucurbita pepo* auch nicht bekannt, daher wurden solche Gene bereits in den 1980er Jahren durch Artkreuzungen aus *C. moschata* in Zucchini übertragen (WHITAKER and ROBINSON 1986, PROVVIDENTI 1997).

Pyramiding von Resistenzgenen ist eine aussichtsreiche Strategie, die Selektion neuer Virusstämme zu verzögern und beständigere Resistenzen zu erzeugen. Diese Methode wurde bei Getreidearten aber auch bei dicotylen Arten wie z.B. Bohnen und Paprika erfolgreich angewendet (WERNER et al. 2005).

Bereits am Anfang unserer Arbeit haben wir beobachtet, dass ZYMV-Isolate aus verschiedenen geografischen Regionen, wie Singapur, Italien und Österreich unterschiedliche

Symptome und Aggressivität an Ölkürbispflanzen zeigten. Diese offensichtliche, genetische Variabilität des Virus birgt die Gefahr, dass eine monogenische Resistenz, von dem Pathogen rasch überwunden werden könnte. Demnach war das Vorhaben, den Ölkürbis mit multipler Resistenz gegen ZYMV auszustatten, nahe liegend. Wir konnten jedoch zunächst feststellen, dass alle von uns getesteten *C. moschata* Resistenzquellen ausreichende Resistenz gegen alle von uns getesteten Isolate hatten. Im Weiteren, haben wir umfangreiche Kreuzungsexperimente mit anschließenden Spaltungsanalysen in künstlichen Infektionstests durchgeführt, um die genetische Struktur der Resistenz in *C. moschata* zu ermitteln. Dabei haben wir in den von uns untersuchten fünf *C. moschata* Genotypen zumindest fünf ZYMV-Resistenzgene eindeutig identifizieren können (PACHNER and LELLEY 2004).

Diese Untersuchungsergebnisse eröffneten uns die Möglichkeit den steirischen Ölkürbis mit einer Mehrfachresistenz gegen potentiell gefährliche ZYMV-Stämme auszustatten.

¹ Universität für Bodenkultur Wien, Department Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Institut für Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

* Ansprechpartner: Ing. Martin PACHNER, martin.pachner@boku.ac.at

Material und Methoden

Als Ölkürbis Ausgangsmaterial verwendeten wir die beiden traditionellen österreichischen Sorten Gleisdorfer Ölkürbis und Retzer Gold. Die toleranten amerikanischen Zucchiniarten Tigress, Jaguar und Puma haben wir von der Fa. Harris Moran Seed Company, Davis California, Dividend und Revenue von Novartis Seeds, Inc. Naples, Florida bezogen. Die auf ZYMV-Resistenz selektierte *C. moschata* Landrassen Menina 15 aus Portugal und Nigerian Local aus Afrika wurden uns von M. Pitrat, INRA, Frankreich, und Soler aus Puerto Rico von Linda Wessel-Beaver, Univ. Puerto Rico, zur Verfügung gestellt. Die ZYMV-anfällige *C. moschata*-Sorte Waltham Butternut und die für die Artkreuzungen *C. pepo* x *C. moschata* verwendete Brücke, die israelische Zucchini Linie True French res., erhielten wir von H.S. PARIS, Neue Ya'ar Research Center, Israel. Diese Sorte enthält zwei bis drei Resistenzgene, ein dominantes Hauptgen, *Zym-1*, und zwei Modifikatorgene, *Zym-2* und *Zym-3*, gegen ZYMV aus der portugiesischen Landrasse Menina die in die Zucchini-Sorte True French übertragen wurden (PARIS and COHEN 2000),

Die Pflanzen für die künstlichen Infektionen wurden im Glashaus unter kontrollierten Bedingungen (23-25°C Tag, 20-22°C Nacht, 50-70% RF, Zusatzbelichtung mit Metallampfen für 14 Std. Tag) gehalten. Für die Infektionen verwendeten wir ein ZYMV Mischisolat, das aus mehreren Einzelisolaten, die an verschiedenen österreichischen Standorten gesammelt wurden, zusammengefügt war (RIEDLE-BAUER 1998). Das Homogenat wurde, kurz vor der Infektion, aus gefrorenen (-20°C) infizierten Blättern, mit einer 1%igen K_2HPO_4 Lösung als Inokulationspuffer, und Celite® 545, um die Blattoberfläche zu verwunden, in einem Mörser auf Eis hergestellt. Die Infektionen erfolgten durch Aufreiben des Homogenats zunächst auf die beiden Keimblätter und 3 Tage später auf das erste Laubblatt.

Die Symptome wurden 10 bzw. 24 Tage nach Infektion ausgewertet. Zur Klassifizierung der Pflanzen als resistent oder anfällig verwendeten wir ein Skala von 0-9, wobei 0 als nicht infiziert, 1-4 als tolerant und 6-9 als anfällig bewertet wurde. Die Bonitur 5 stellt eine nicht eindeutig zuordenbare Übergangssituation dar. Es soll festgehalten werden, nachdem die Grenze zwischen Resistenz und Toleranz nicht klar definierbar ist, sprechen wir von leichter bis hin zu tolerabler Symptomausprägung von einer Resistenz.

Für die Markeranalysen wurden, zu Beginn der Untersuchungen, in einer Bulk Segregant Analyse, 1000 RAPD-Primer (Random Amplified Polymorphic DNA)

getestet. Wir fanden zunächst 24 Marker, deren Auftreten mit dem Resistenzgen *Zym-1* (Men1-Resistenz) und 5 Marker, mit *Zym-2* (Men2-Resistenz) (PARIS and COHEN 2000) korrelierten (98% bzw. 95%). Je ein RAPD Marker wurde mittels Reamplifizierung und Sequenzierung der Bande in einen SCAR-Marker (Sequence Characterized Amplified Region) umgewandelt. In einer Sammlung von 500 *Cucurbita*-spezifischer SSR-Markern, die im Rahmen eines FWF-Projektes an unserem Institut entwickelt wurden (GONG et al. 2008), fanden wir einen mit dem Resistenzgen *Zym-0* (NL2-Resistenz) (PARIS and BROWN 2005) sehr eng gekoppelten (>99%) Marker.

Die Einführung der *C. moschata* ZYMV-Resistenzgene in Ölkürbis durch Artkreuzung hat zu vier verschiedenen Resistenzen mit insgesamt fünf wirksamen Resistenzgenen geführt. Sie sind in *Tabelle 1* beschrieben.

Ergebnisse und Diskussion

Das erste Resistenz-Gen gegen das ZYMV haben wir aus amerikanischen Zucchiniarten in den steirischen Ölkürbis eingekreuzt. Dieses Gen stammte aus der nigerianischen *C. moschata* Landsorte Nigerian Local. Es zeigte gute Resistenz gegen einige ZYMV-Virusstämme (PROVIDENTI 1997). Die zweite Resistenz haben wir aus einer israelischen Zucchini Linie in den Ölkürbis eingekreuzt, sie stammte ursprünglich aus der *C. moschata* Landrasse Menina aus Portugal (PARIS and COHEN 2000). Die Ausprägung von Reaktionssymptomen war jedoch nach künstlicher Infektion mit unserem ZYMV-Isolat bei diesen beiden Genotypen klar unterscheidbar. Diese Beobachtung veranlasste uns dazu, umfangreiche Kreuzungsexperimente und Spaltungsanalysen in künstlichen Infektionsversuchen durchzuführen, um die genetische Struktur dieser Resistenzen in *C. moschata* zu untersuchen, aber auch um eventuell weitere Resistenzgene in *C. moschata* zu finden. Letztendlich fanden wir in *C. moschata* fünf Resistenzgene (PACHNER and LELLEY 2004). Wir haben danach alle von uns identifizierten Resistenzen aus *C. moschata* in Ölkürbis eingekreuzt. Da sich Ölkürbis nicht direkt mit *C. moschata* kreuzen lässt, mussten wir Brückenkreuzung mit Zucchini durchführen.

Für unseren ersten Pyramidingversuch standen uns zunächst das dominante Resistenzgen *Zym-1* aus Menina und das von uns identifizierte rezessive *zym-4* aus Nigerian Local zur Verfügung, aber nur für *Zym-1* hatten wir einen molekularen Marker. Somit war eine eindeutige Selektion von homozygoten doppelresistenten Pflanzen in der F2 nicht möglich. Daher haben wir für die Erzeugung der F2-Nachkommen

Tabelle 1: Resistenzgene gegen ZYMV. Die Gensymbole beziehen sich auf die Genliste von PARIS and BROWN (2005). Das Resistenzgen *Zym-3* konnten wir in unserem Zuchtprogramm nicht identifizieren; für die NL1-Resistenz wurde noch kein Gensymbol vergeben, im Text wird dafür *zym-4* verwendet. Für die fett gedruckten Resistenzgene konnten gekoppelte Marker identifiziert werden.

Resistenz	Gensymbol	Quelle	Erbverhalten	
			beschrieben in Literatur	in Ölkürbis
Men1	<i>Zym-1</i>	Menina	dominant	dominant
Men2	<i>Zym-2</i>	Menina	ergänzender dominanter Modifikator zu <i>Zym-1</i>	
Men3	<i>Zym-3</i>	Menina	ergänzender dominanter Modifikator zu <i>Zym-1</i>	
NL1	(<i>zym-4</i>)	Nigerian Local	unvollständig dominant	rezessiv
NL2	<i>Zym-0</i>	Nigerian Local	dominant	dominant
Sol	<i>zym^{mos}</i>	Soler	rezessiv	unvollständig dominant

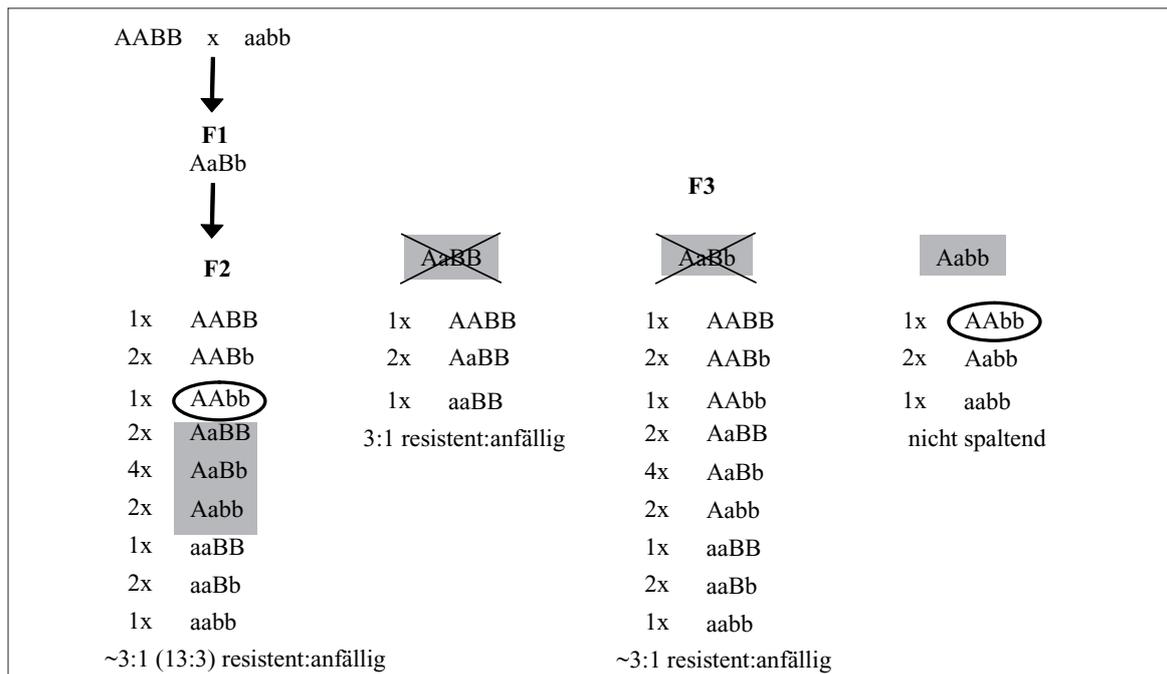


Abbildung 1: Zur Darstellung steht AA für die dominante Men1-Resistenz (*Zym-1*, markerselektiert) und bb für die rezessive NL1-Resistenz (*zym-4*, kein Marker). In der F2 können die doppelt homozygoten Pflanzen (eingekreist) nicht eindeutig identifiziert werden, weil die tolerantanten Pflanzen in Bezug auf ihre genetische Struktur nicht ausreichend unterscheidbar sind. Nur eine von drei möglichen F3-Populationen, deren Mutterpflanzen (F2) mit Marker auf Aa selektiert wurden (grau unterlegt) wird keine phänotypische Spaltung für die Resistenz zeigen (ganz rechts), weil darin alle Pflanzen für die NL1-Resistenz homozygot (bb) sind. Der Menina-Marker ermöglicht anschließend, aus dieser Population die homozygot doppelresistenten Genotypen auszuwählen.

schaften (F3-Populationen) jene F2-Pflanzen ausgewählt, die mit dem Marker für *Zym-1* als heterozygot identifiziert werden konnten. Nur in einer von drei möglichen F2-Nachkommenschaften war keine phänotypische Spaltung für die Resistenz zu erwarten, weil darin alle Pflanzen für die NL1-Resistenz (*zym-4*) homozygot sind (Abbildung 1). Der Menina-Marker ermöglichte anschließend, aus dieser F3-Population die homozygot doppelresistenten Genotypen zu selektieren.

Da die beiden Resistenzen, *Zym-1* und *zym-4*, aufgrund spezifischer Reaktionssymptome nach künstlicher Infektion unterscheidbar sind, war es möglich die Anwesenheit des Resistenzgens *zym-4* aufgrund der für diese Resistenz spezifischen Symptome festzustellen. Das Vorhandensein des Resistenzgens *Zym-1* konnte anhand des molekularen Markers sichergestellt werden. Somit konnten wir, bereits in einem Infektionstest an der F2, Pflanzen identifizieren, die das Resistenzgen *zym-4* trugen und den Marker für *Zym-1* hatten. Dadurch konnten wir die Anzahl der potentiellen F3-Populationen deutlich einschränken.

Die erzeugten Pyramidingpopulationen, in denen die beiden Resistenzgene *Zym-1* und *zym-4* kombiniert sind, wurden in der F5-Generation einem Infektionstest unterzogen. Aus drei F3-Populationen sind 13 Linien hervorgegangen (Pyr-1a, b u. c in Tabelle 2), die bereits einen deutlich erhöhten Grad an Resistenz mit einem Boniturmittelwert von 2,8 aufwiesen. Die resistente Ölkürbislinie nur mit *zym-4* zeigte ein Boniturmittel von 4,5, die mit *Zym-1* einen Wert von 4,0 (Tabelle 2).

In unserem zweiten Pyramidingexperiment konnten wir bereits drei Resistenzgene kombinieren, da wir für zwei davon (*Zym-1* und *Zym-2*) molekulare Marker zur Verfügung hatten. Auch in diesem Versuch standen uns, für die Überprüfung im Infektionstest, 13 Linien aus drei F3-Populationen zur Verfügung. Die drei Resistenzgene lassen sich in verschiedenen Kombinationen zusammenfügen. Linien, die das dominante Resistenzgen *Zym-1* in Kombination mit dem rezessiven Gen *zym-4* besitzen (Pyr-2a in Tabelle 2), sind als Wiederholung des ersten Versuchs zu betrachten und unterscheiden sich von diesem auch in ihren Boniturmitteln nicht.

Linien mit der Kombination der drei Resistenzgene *Zym-1*, *Zym-2* und *zym-4* (Pyr-2c) erreichten erwartungsgemäß den höchsten Grad an Resistenz (Boniturmittel 2,2).

Interessanterweise erreichten Linien, die das rezessive Resistenzgen *zym-4* in Kombination mit dem Modifikatorgen *Zym-2* besitzen (Pyr-2b), ebenfalls ein besseres Resistenzniveau (3,4) als die Ausgangslinie Ölk. NL1-Res (4,5) mit *zym-4*. Genotypen mit dem Resistenzgen *Zym-2* bei Abwesenheit von *Zym-1* sind anfällig, da *Zym-2* nur als ergänzender Modifikator zu *Zym-1* wirkt. Hier wurde die Wirkung eines Resistenzgens aus Nigerian Local (*zym-4*) durch ein Modifikatorgen aus Menina (*Zym-2*) verstärkt (Tabelle 2).

In weiteren Versuchen gelang es uns schließlich vier Resistenzgene in einem Genotyp zu kombinieren.

Pflanzen aus Pyr-3, mit den beteiligten Resistenzgenen *Zym-1*, *Zym-2*, *zym-4* und *zym^{mos}*, erreichten in einem ersten

Tabelle 2: Mittlere Boniturwerte der verwendeten Resistenzquellen und den daraus entstandenen Zuchtlinien. Die Klassifizierung der Symptome erfolgte unter Verwendung einer Skala von 0-9, wobei Pflanzen mit der Boniturnote 0 als nicht infiziert, 1-4 als resistent und 6-9 als anfällig bewertet wurden. Die Boniturnote 5 stellt eine nicht eindeutig zuordenbare Übergangssituation dar.

Genotyp	Resistenzgen(e)	Boniturmittel
Nigerian Local	<i>Zym-0</i> + <i>zym-4</i>	0,5
Menina 15	<i>Zym-1</i> (+ <i>Zym-2</i> + <i>Zym-3</i>)	2
Soler	<i>zym^{mos}</i>	3
Ölkürbis	keine	7,4
Zucchini Tigress	<i>zym-4</i>	4,5
Ölk. NL1-Res	<i>zym-4</i>	4,5
Zucchini TRF res.	<i>Zym-1</i> + <i>Zym-2</i> + <i>Zym-3</i>	4
Ölk. Men1-Res	<i>Zym-1</i> (+ <i>Zym-2</i> + <i>Zym-3</i> ?)	4
Ölk. Sol-Res	<i>zym^{mos}</i> (+ <i>Zym-3</i> ?)	2,5
Ölk. NL2-Res	<i>Zym-0</i> + <i>zym-4</i>	1,7
Pyr-1a	<i>Zym-1</i> + <i>zym-4</i>	2,8
Pyr-1b	<i>Zym-1</i> + <i>zym-4</i>	2,7
Pyr-1c	<i>Zym-1</i> + <i>zym-4</i>	2,8
Pyr-2a	<i>Zym-1</i> + <i>zym-4</i>	2,7
Pyr-2b	<i>Zym-2</i> + <i>zym-4</i>	3,4
Pyr-2c	<i>Zym-1</i> + <i>Zym-2</i> + <i>zym-4</i>	2,2
Pyr-3	<i>Zym-1</i> + <i>Zym-2</i> + <i>zym-4</i> + <i>zym^{mos}</i>	2,5
Pyr-4	<i>Zym-1</i> + <i>Zym-2</i> + <i>Zym-0</i> + <i>zym-4</i>	1,5

Infektionstest ein dem ersten Versuch mit zwei kombinierten Resistenzgenen vergleichbares Resistenzniveau (2,5). Wenn man berücksichtigt, dass *zym-4* und *zym^{mos}* rezessive Resistenzgene sind, und diese erst im homozygoten Zustand voll zur Ausprägung kommen, kann man erwarten, dass sich das Resistenzniveau nach einer Selbstung noch weiter verbessert.

Pflanzen aus Pyr-4, mit den beteiligten Resistenzgenen *Zym-1*, *Zym-2*, *zym-4* und *Zym-0*, erreichten das bisher höchste Resistenzniveau (1,5 Tabelle 2). Auch in dieser Kombination ist noch eine Steigerung zu erwarten, wenn *zym-4* im homozygoten Zustand voll zur Ausprägung kommt.

Markerselektierte F2-Pflanzen der beiden zuletzt beschriebenen Kreuzungskombinationen, sowie F1-Pflanzen einer Zweifachhybride (mit allen fünf Resistenzgenen) konnten wir bisher nur am Feld beobachten. Es hat sich jedoch schon dabei gezeigt, dass diese Pflanzen ein sehr hohes Resistenz-

niveau haben, sie blieben über die gesamte Vegetationsperiode symptomfrei. Alle anderen Pflanzen am gleichen Feld, wiesen ein ihrer genetischen Konstitution entsprechendes Krankheitsbild auf, alle diese Pflanzen entwickelten mehr oder weniger starke Virussymptome.

Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse unserer hier vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass die Kombination mehrerer ZYMV-Resistenzgene in Ölkürbis einen additiven Effekt hat. Während Ölkürbislinien mit nur einem Resistenzgenen einen mittleren Boniturnote von 4,5 haben, erreichen Genotypen mit vierfacher Resistenz die Durchschnittsnote von 1,5.

Danksagung

Die Arbeiten wurden vom BMLFUW und später in Kooperation mit der Saatzucht Gleisdorf GmbH im Rahmen mehrerer Forschungsprojekte (FFF und FFG) finanziert.

Literatur

- GONG, L., STIFT, G., KOFLER, R., PACHNER, M. and LELLEY, T., 2008: Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L., Theor. Appl. Genet. 117, 37-48.
- PACHNER, M. and T. LELLEY, 2004: Different genes for resistance to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) in *Cucurbita moschata*. In: A. Lebeda and H.S. Paris (eds.), Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. Proc. *Cucurbitaceae* 2004. Palacky Univ., Olomouc, Czech Republic. pp, 237-243.
- PARIS, H.S. and R.N. BROWN, 2005: The genes of pumpkin and squash, HortScience 40, 1620-1630.
- PARIS, H.S. and S. COHEN, 2000: Oligogenic inheritance for resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita pepo*, Ann. Appl. Biol. 136, 209-214.
- PROVVIDENTI, R., 1997: New American summer squash cultivars possessing a high level of resistance to strains of zucchini yellow mosaic virus from China, Cucurbit Genet. Coop. Rep. 20, 57-58.
- RIEDLE-BAUER, M., 1998: Ölkürbis & Co.: Was tun gegen das Zucchini gelbmosaikvirus? Der Pflanzenarzt 4/98, 1-4.
- WERNER, K., W. FRIEDT and F. ORDON, 2005: Strategies for Pyramiding Resistance Genes Against the Barley Yellow Mosaic Virus Complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2), Mol. Breeding 16, 45-55.
- WHITAKER, T.W. and R.W. ROBINSON, 1986: Squash breeding, Breeding Vegetable Crops, M. J. Bassett, ed. AVI Publishing Co, pp, 209-242.