

# Züchtung virustoleranter Ölkürbissorten mit konventionellen und molekularen Selektionsmethoden

T. LELLEY, G. STIFT und M. PACHNER

## Einleitung

Der katastrophale Viruseinbruch im Jahr 1997 hat gezeigt, dass die in Österreich angebauten Ölkürbissorten keinen genetisch bedingten Schutz gegen das Zucchini Gelbmosaikvirus (ZYMV) besitzen. Ziel des hier beschriebenen Vorhabens war, solchen Schutz in die österreichischen Ölkürbissorten einzuführen. Genetisch bedingte Virusresistenz ist allerdings in der Art *Cucurbita pepo* nicht vorhanden (WHITAKER and ROBINSON 1986), daher müssen solche Gene aus verwandten Arten durch Artkreuzungen übertragen werden. Verwandte Arten, die Virusresistenzgene besitzen, sind *C. moschata* und *C. maxima*. Während über die genetische Struktur der Resistenz in *C. moschata* Literaturangaben vorliegen (MUNGER and PROVVIDENTI 1987, Paris et al. 1988, GILBERT-ALBERTINI et al. 1993), ist die Genetik der Resistenz in *C. maxima* unbekannt. Darüber hinaus sollen Kreuzungen zwischen *C. pepo* und *C. moschata* erfolversprechender sein, als solche zwischen *C. pepo* und *C. maxima* (ROBINSON, persönliche Mitteilung). PROVVIDENTI berichtete 1997 über amerikanische Zucchiniorten, die eine gute Resistenz gegen einige ZYMV-Virusstämme zeigen (PROVVIDENTI 1997). Die Quelle dieser Resistenz war in allen diesen Sorten eine nigerianische Landsorte aus der Art *C. moschata* mit der Bezeichnung „Nigerian Local“.

## Material und Methoden

Aufgrund der Informationen von Herrn Provvidenti von der Cornell Univ. (persönliche Mitteilung und Provvidenti 1997) haben wir uns aus den USA folgende fünf Zucchiniorten schicken lassen: Tigress, Jaguar und Puma von der Fa. Harris Moran Seed Company, Davis California, sowie Dividend und Revenue von Novartis Seeds, Inc. Naples, Florida. In einem künstlichen Infektionsver-

such haben diese Zucchiniorten eine gute Toleranz gegen das österreichische Virusisolat gezeigt, während im gleichen Versuch die fünf österreichischen Genotypen, die als Empfänger des Toleranzgens vorgesehen waren, es waren zwei Zuchtstämme von der Saatzucht Gleisdorf (SZG) und drei von der Fa. VitroPlant (VIT), die Infektion nicht überlebten.

Es folgten Kreuzungen zwischen den österreichischen Ölkürbis-Genotypen und den amerikanischen Zucchiniorten. Insgesamt wurden 10 Kreuzungskombinationen erstellt. Die erhaltenen F1-Pflanzen wurden teils geselbstet, teils, mit den jeweiligen österreichischen Kreuzungseltern, zurückgekreuzt. Das Zuchtprogramm zur Übertragung der ZYMV-Toleranz in den österreichischen Ölkürbis ist in *Abbildung 1* dargestellt.

### Selbstungsnachkommenschaften

Zwei von den geselbsteten F1-Kreuzungsnachkommenschaften wurden im Feld herangezogen. Die beiden F2-Populationen bestanden aus je ca. 80 Einzelpflanzen. Jede einzelne F2-Pflanze wurde geselbstet. Von den zwei Populationen konnten schließlich von je 46 bzw. 48 Einzelpflanzen F3-Samen gewonnen werden. Nachkommenschaften (F3) der F2-Pflanzen wurden im Bundesamt und Forschungszentrum für Landwirtschaft (BFL) in Infektionsversuchen getestet, um einerseits das genetische Verhalten der Toleranz zu studieren, andererseits um für die Markeranalyse das entsprechende Pflanzenmaterial zusammenzustellen.

Dazu wurden zunächst von der Kombination VIT x DIV von 43 F2-Pflanzen mehr als 500 F3-Nachkommenschaft in einer Isolationskabine des BFL herangezogen. Diese wurden sowohl auf den beiden Keimblättern, als auch auf dem ersten Laubblatt mit dem Virusisolat infiziert. Zwei Wochen später erfolgte die erste, eine weitere Woche darauf die zweite Bonitur. Die Reaktion einer Nach-

kommenschaft auf die künstliche Infektion sollte Aufschluss über die genetische Konstitution der F2-Pflanze (AA, Aa oder aa) geben. Nachkommenschaften von AA-F2-Pflanzen sollten einheitlich anfällig, solche von aa einheitlich tolerant sein. Aa-Nachkommen sollten aufspalten. Die Ergebnisse dieser Bonitur sind in *Tabelle 1* dargestellt. Es folgte der Infektionsversuch mit der zweiten Kombination (SZG x TIG).

In vorausgegangenen Infektionsversuchen erwiesen sich die F1-Pflanzen aller Kombinationen zwischen den toleranten Zucchiniorten und den Ölkürbis-Genotypen ähnlich anfällig wie ihre österreichischen Kreuzungseltern. Demnach verhält sich die Toleranz erwartungsgemäß als rezessives Merkmal.

Die Auswertung der F2-Nachkommenschaften der beiden Kreuzungskombinationen ergab ein undeutliches Bild. Auch wenn die Kombination VIT x DIV noch als eine 1:2:1 Spaltung interpretiert wurde, muss man festhalten, dass auch die Nachkommenschaften, die als homozygot „aa“ angesehen wurden, Pflanzen enthielten, die hochgradig anfällig waren (*Tabelle 1*). Dieses Phänomen kann mit dem Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Ausprägung des Merkmals Toleranz gedeutet werden. Die Spaltung der Kreuzungskombination SZG x TIG fiel noch undeutlicher aus (nicht gezeigt).

### Die „Moschata-Resistenz“

Über die in den Zucchiniorten enthaltene Resistenz gibt es unterschiedliche Angaben. Provvidenti et al. (1984) teilen mit, dass die in Nigerian Local (Butternut) gefundene ZYMV-Resistenz sich gut auf andere *C. moschata* Genotypen übertragen lässt. Die Resistenz wird auf ein partiell dominantes Gen zurückgeführt, wobei auch Modifikatoren angenommen werden. Die Ausprägung der Resistenz in *C. moschata* x *C. pepo*

**Autoren:** Prof. Dr. Tamas LELLEY, G. STIFT und M. PACHNER, IFA Tulln, Abteilung Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, A-3430 TULLN



**Tabelle 1: Boniturnoten der F3-Nachkommenschaften von 43 F2-Pflanzen der Kombination VIT x DIV. Durchschnittswerte von Boniturnoten  $\geq 4,5$  (mit dunkelgrauem Hintergrund) zeigen eine einheitlich hochgradig anfällige F3-Nachkommenschaft mit der angenommenen genetischen Konstitution von AA der F2-Pflanze. Durchschnittswerte von  $\leq 3,5$  (mit hellgrauem Hintergrund) können von aa F2-Pflanzen stammen. Durchschnittswerte zwischen diesen beiden Kategorien können Aa F2-Pflanzen sein. Diese Grenzen sind willkürlich gewählt. Die Tatsache, dass in F2-Nachkommenschaften mit Durchschnittswert  $\leq 3,5$  auch Einzelpflanzen mit Boniturnoten von 5 auftreten, kann als Hinweis für eine Rolle des Hintergrundes in der Merkmalsausprägung gedeutet werden.**

F2 Pflanze	1	5	6	8	12	13	14	16	18	20	21	25	26	27	28	30	31	33	34	35	37	38	39	44	45	46	
F3	3	5	4	4	5	3	2	5	3	3	5	5	4	5	4	5	4	5	3	5	5	5	4	5	4	5	
	1	3	4	3	5	4	3	4	4	3	2	5	5	5	4	3	5	4	2	5	5	5	3	4	4	4	
	2	4	5	5	2	4	4	4	4	5	3	4	4	3	5	5	5	2	5	5	2	1	5	3	5	5	
	3	5	3	4	5	4	5	3	4	4	4	5	4	4	4	5	5	4	2	5	3	5	4	5	3	4	
	4	5	5	3	4	2	4	5	4	3	4	5	2	4	4	3	3	5	3	5	5	5	5	4	3	5	
	5	5	5	1	5	5	5	5	4	4	4	5	3	3	4	5	4	5	3	5	2	5	2	5	2	5	
	3	4	5	1	4	2	3	5	4	3	5	5	5	5	4	4	5	4	3	4	5	5	5	3	5	5	
	4	4	4	2	5	4	2	5	5	4	5	5	5	4	3	5	3	3	5	4	5	5	2	4	5	5	
	4	5	4	3	5	2	4	5	5	3	4	5	4	5	3	4	5	2	5	3	3	3	3	4	4	5	
	3	3	4	1	5	4	3	5	4	2	5	3	4	5	5	4	5	5	4	5	4	5	4	5	5	2	4
	3	5	4	4	5	2	5	5	1	2	2	5	5	5	5	5	3	5	3	5	3	5	5	4	3	5	5
	4	3	5	2	5	2	4	5	3	4	4	5	4	5	2	3	5	4	5	3	5	4	5	5	5	3	4
	4	5	3	3	5	2	3	5	5	3	4	5	2	4	5	3	2	4	5	5	5	4	4	5	4	5	5
	4	5	5		2	2		3		2				4		4		4		5	5	5		5		2	
4	5	5									4																
$\bar{x}$	3,4	4,4	4,3	2,8	4,8	3,0	3,5	4,7	3,8	3,2	3,9	4,7	3,9	4,5	3,8	4,0	3,9	4,5	3,1	4,8	3,9	4,5	4,0	4,4	3,2	4,7	

F2 Pflanze	51	53	54	56	57	61	62	64	65	66	67	69	72	73	75	76	80
F3	3	5	4	5	5	1	4	5	1	5	4	5	4	3	5	5	2
	2	3	4	4	2	5	3	5	2	5	4	4	4	3	5	5	3
	5	2	3	2	3	1	4	5	4	5	4	4	3	4	5	5	4
	5	3	3	5	4	5	3	5	2	5	4	4	4	3	5	5	3
	3	2	5	5	3	5	5	5	4	5	4	4	3	3	5	4	2
	3	3	2	5	3	5	5	5	2	5	5	5	3	3	5	5	2
	3	2	4	5	3	4	5	4	5	4	5	4	5	4	5	5	4
	4	5	2	2	2	5	4	5	2	5	5	4	5	4	5	5	2
	5	5	1	5	5	5	5	5	3	5	4	5	4	3	5	5	4
	3	5	3	4	2	5	4	5	5	5	4	4	5	3	5	3	4
	2	3	3	5	3	5	5	5	5	3	5	4	3	5	5	2	
	3	3	1	5	3	5	5	5	5	5	4	3	2	5	2		
	3	5	5	5		2					3	4		5	2		
	3			5							5	5		5	3		
$\bar{x}$	3,4	3,5	3,1	4,4	3,2	3,8	4,2	5,0	2,9	5,0	4,1	4,3	3,8	3,2	5,0	4,7	2,9

Kreuzungen fällt weniger stark aus. Aus solchen *C. moschata* x *C. pepo* Kreuzungen entstanden jedoch später die amerikanischen „summersquash“ (Zucchini) Sorten, die in unseren Kreuzungen verwendet wurden, und die nach PROVVIDENTI (1997) gute Toleranz gegen einige „strains“ des ZYMV zeigten. In einer persönlichen Mitteilung von PROVVIDENTI wird diese Toleranz in „summersquash“ als rezessiv bezeichnet. Untersuchungen über die Genetik der ZYMV-Resistenz in einer anderen *C. moschata* Sorte, Menina, aus Portugal, mittels intraspezifischer Kreuzungen, ergaben für die Resistenz eine monogen dominante Vererbung (PARIS et al. 1988). In einer persönlichen Mitteilung bezeichnete H. PARIS diese Resistenz jedoch als komplex. Ob die Resistenz in Nigerian Local und in Menina durch die gleichen oder durch verschiedene Gene bestimmt wird, ist nicht bekannt. Unsere Infektionsversuche, die wir mit dem F2-Material aus den Kreuzungen Zucchini x Ölkürbis durchgeführt haben, ergaben in der Kombination SZG x TIG ein Spaltungsverhältnis von 26:11 anfällig/tolerant,

für die Kombination VIT x DIV ein Verhältnis von 32:4. Diese Werte legen eine einfache Vererbung des Merkmals Toleranz nahe. Anhand dieser Zahlen ist es jedoch auch denkbar, dass der Zucchini-Elter Dividend in der zweiten Kombination (mit dem Zuchtstamm VIT) eine durch zwei Gene bedingte Toleranz besitzt oder starke Modifikatoren im genetischen Hintergrund in der Ausprägung des Merkmals eine Rolle spielen.

Es lässt sich spekulieren, ob die Resistenz in dem ursprünglichen *C. moschata* (Nigerian Local) durch mehrere Gene bedingt wird und durch die Kreuzung u. U. eine unterschiedliche Zahl von diesen Resistenzgenen in die Zucchiniarten übertragen wurden (persönliche Mitteilung H. Paris). Das könnte auch einer der Gründe für die schwächere Ausprägung des Merkmals in *C. pepo* (nur Toleranz statt Resistenz, wie in *C. moschata*) sein.

#### Zur Vererbung der Schalenlosigkeit

In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben darüber, wie viele Gene die Schalenlosigkeit der Kürbissamen bestimmen. Von SCHÖNINGER 1950,

WEILING und PRYM von BECHERER 1951, MUDRA und NEUMANN 1952 wurden zwei bis drei Gene, bzw. Hauptgene und Modifikatoren angenommen. GREBENŠEIKOV (1954) kam aufgrund eigener Untersuchungen zu dem Schluss, dass das Merkmal nur durch ein Hauptgen bestimmt wird, wobei Modifikatoren möglich sind.

Die Samenschale (Testa) des Kürbisses besteht aus fünf morphologisch scharf unterscheidbaren Schichten, die jeweils aus einer oder mehreren Zelllagen bestehen (HEINISCH und RUTHENBERG 1950): Epidermis (1), Hypodermis (2), Sklerenchym (3), Parenchym (4) sowie Chlorenchym (5). Die Beschalung kommt durch die Verholzung (Lignineinlagerung) der Zellwände in den Schichten 2 bis 4 zustande. Die Schalenlosigkeit entsteht durch das Ausbleiben dieses Vorganges. In diesem Fall bestimmt der Protochlorophyllgehalt der 5. Schicht die grüne Farbe der Samen, welche durch die darüberliegenden, ausgetrockneten und zusammengefallenen Zellschichten durchscheint. Die umgangssprachliche Bezeichnung „schalenlos“ ist botanisch-morphologisch gesehen nicht richtig. Mikroskopische Untersuchungen beweisen, dass auch bei „schalenlosen“ Samen alle Zellschichten der Testa vorhanden sind, wenn auch nur noch rudimentär. Darum haben HEINISCH und RUTHENBERG (1950) die Bezeichnung „weichschalig“ vorgeschlagen, während SCHÖNINGER (1950) den Ausdruck „dünnchalig“ verwendet. TEPPNER (2000) spricht auch von „thin coated“ Samen.

An sich wäre es naheliegend anzunehmen, dass diese Eigenschaft durch die Mutation eines Einzelgens, welches für die Lignifizierung verantwortlich ist, unterbrochen wird, die Ausprägung des Merkmals jedoch durch den genetischen Hintergrund modifiziert werden kann.

Herr Prof. TEPPNER, TU Graz, kommt andererseits in seiner kürzlich veröffentlichten Publikation aufgrund eigener Untersuchungen zu dem Schluss, dass die Vererbung der Schalenlosigkeit sehr viel komplexer sei, als bisher angenommen wurde (6 bis 9 Gene). Er postuliert für die Verholzung jeder Testaschicht ein separates Gen (TEPPNER 2000). Unsere Versuche erbrachten folgendes Ergebnis: In der Selbstung der F2 der Kombi-

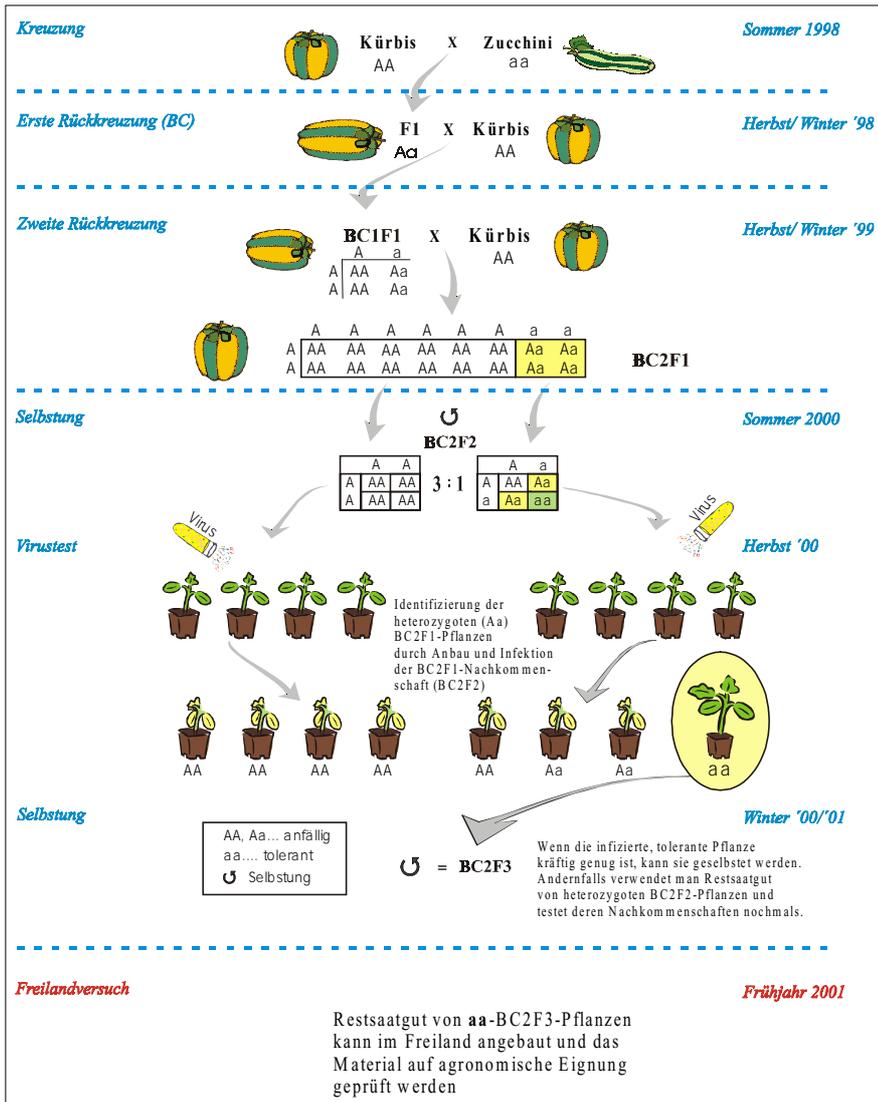


Abbildung 1: Züchtungsschema und Zeitplan der Erzeugung ZYMV-toleranten Ölkürbisses unter der Annahme, dass die Toleranz monogen rezessiv vererbt wird

nation SZG x TIG fanden wir in 35 Nachkommenschaften beschaltete Samen neben 11 Nachkommenschaften, deren Samen schalenlos waren. In der Kombination VIT x DIV betrug dieses Verhältnis 39:9. Diese Zahlenverhältnisse sind von einer angenommenen 3:1 Spaltung nicht signifikant verschieden ( $p > 5\%$ ). In allen Fällen zeigten allerdings die schalenlosen Samen vor allem an den Rändern und manchmal an den Enden der Samen Ansätze von leichter Schalenbildung, wie es von Herrn TEPPNER (2000) beschrieben wurde (Abbildung 2). Nach der ersten Rückkreuzung kommt es zu einer 1:1 Spaltung zwischen beschalt und schalenlos, wobei die schalenlosen Samen nur noch in seltenen Fällen eine leichte Verholzung der Ränder aufweisen. Nach zwei Rückkreuzun-

gen sind jedoch die Samen hinsichtlich Schalenlosigkeit von den schalenlosen Eltern nicht mehr zu unterscheiden (Abbildung 2). Unsere Beobachtungen unterstützen eher die Annahme eines rezessiven Hauptgens für die Schalenlosigkeit und den möglichen Einfluß des jeweiligen genetischen Hintergrundes. Die züchterische Konsequenz aus diesen Befunden ist, dass in einem Rückkreuzungsprogramm die Wiedergewinnung der Schalenlosigkeit als Qualitätsmerkmal für den steirischen Ölkürbis eine relativ einfache Aufgabe ist.

#### Das Rückkreuzungsprogramm

Um den steirischen Ölkürbistypus wiederherzustellen, müssen die F1-en mit dem jeweiligen Ölkürbiselter wiederholt zurückgekreuzt werden. Die ersten

Rückkreuzungen erbrachten in 11 Kombinationen keimfähige Samen. Vier von diesen Kombinationen wurden im Winter 99/00 mit dem rekurrenten Kreuzungselter ein zweites Mal zurückgekreuzt (Abbildung 1). Eine Selbstung dieser Rückkreuzungsgeneration wurde im Sommer 2000 durchgeführt. Anschließend Nachkommenschaftsprüfung durch Resistenztests der ersten ausgewählten 50 Selbstungen im BFL erbrachten eine unerwartet große Zahl von Nachkommenschaften mit einer eindeutigen 3:1 Spaltung für Anfälligkeit und Toleranz (Tabelle 2). Die toleranten Pflanzen werden derzeit erneut geselbstet. Die Nachkommenschaften dieser Selbstung werden im Frühjahr 2001 einem weiteren Infektionstest unterzogen, und jene Nachkommenschaften, welche sich bei diesem Infektionstest als homogen (homozygot) tolerant erweisen, werden auf Anbauwürdigkeit unter Feldbedingungen geprüft. Damit konnte das gesteckte Ziel dieses Forschungsprojektes, die Virusresistenz (Toleranz) in den steirischen Ölkürbis zu übertragen, in nur drei Jahren erreicht werden.

#### Erste Markeranalyse

RAPD-Marker wurden für die Markierung des Resistenzgens gesucht. Molekulare Marker sind vom Phänotyp unabhängig, werden einfach vererbt und sind leicht nachweisbar. Sie zeigen das

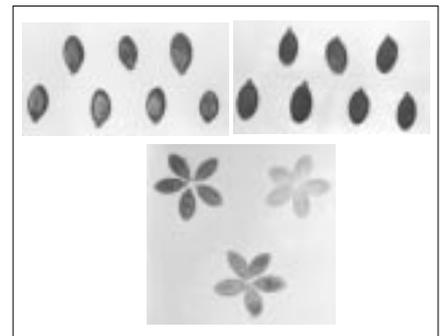


Abbildung 2: Samen des schalenlosen Ölkürbisses (a). In der F2 der Kreuzung Ölkürbis und Zucchini kommt es zu einer 3:1 Spaltung, beschalt:schalenlos, jedoch in allen Fällen zeigen die schalenlosen Samen Ansätze von leichter Verholzung, vor allem an den Rändern und an den Enden der Samen (c). Nach zwei Rückkreuzungen sind jedoch die Samen (b) hinsichtlich Schalenlosigkeit von den schalenlosen Eltern (a) nicht mehr zu unterscheiden.



Betreuung des Untersuchungsmaterials während der Infektionsversuche.

## Literatur

- BROWN, R.N. and J.R. MYERS, 2000: Search for molecular markers linked to ZYMV resistance in squash. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 23, 69-70.
- GILBERT-ALBERTINI, F., H. LECOQ, M. PITRAT and J.L. NICOLET, 1993: Resistance of *Cucurbita moschata* to watermelon mosaic virus type 2 and its genetic relation to resistance to zucchini yellow mosaic virus. *Euphytica* 69, 231-237.
- GREBENŠEIKOV, I., 1954: Zur Vererbung der Dünnschaligkeit bei *Cucurbita pepo* L. *Der Züchter* 24, 162-166.
- HEINISCH, O. und M. RUTHENBERG, 1950: Die Bedeutung der Samenschale für die Züchtung des Ölkürbis. *Z. Pflanzenzüchtg.* 29, 159-174.
- MICHELMORE, R.W., I. PARAN and R.V. KESSELI, 1991: Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9828-9832.
- MUDRA, A. und D. NEUMANN, 1952: Probleme und Ergebnisse der Müncheberger Ölkürbiszüchtung. *Der Züchter* 22, 99-105
- MUNGER, H.M. and R. PROVVIDENTI, 1987: Inheritance of resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita moschata*. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 10, 80-81.
- PARIS, H.S., S. COHEN, Y. BURGER and R. YOSEPH, 1988: Single-gene resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita moschata*. *Euphytica* 37, 27-29.
- PROVVIDENTI, R., D. GONSALVES and H.S. HUMAYDAN, 1984: Occurrence of zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from Connecticut, New York, Florida, and California. *Plant Disease* 68, 443-446.
- PROVVIDENTI, R., 1997: New American summer squash cultivars possessing a high level of resistance to a strain of zucchini yellow mosaic virus from China. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 20, 57-58.
- SCHÖNINGER, G., 1950: Genetische Untersuchungen an *Cucurbita pepo*. *Der Züchter* 20, 321-336.
- TEPPNER, H., 2000: *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*) – History, seed coat types, thin coated seeds and their genetics. *Phyton* 40, 1-42.
- WEILING, F. und E. PRYM von BECHERER, 1951: Zur Faktorenanalyse der Testausbildung beim Kürbis. *Ber. deutsch. bot. Ges.* 62, 147-148.
- WHITAKER, T.W. and R.W. ROBINSON, 1986: Squash breeding. In: *Breeding vegetable crops*. Ed.: M.J. Bassett. Avi, Westport, CT.