

Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger: Technische Universität München	Förderkennzeichen: 2814302107
Vorhabenbezeichnung: Charakterisierung von Resistenzquellen gegen das Soil-borne cereal mosaic virus - SBCMV und das Wheat spindle streak mosaic virus – WSSMV in genetischen Ressourcen von Roggen sowie deren Nutzung für die Züchtung virusresistenter Sorten Teilprojekt 3: Molekulargenetische Identifizierung der Virusresistenz und Erstellung molekularer Marker für die Resistenzzüchtung	
Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2008 – 31.07.2011	
Berichtszeitraum: 01.04.2008 – 31.07.2011	

I. Kurzdarstellung des Forschungsvorhabens

1. Aufgabenstellung

Das Forschungsvorhaben stellte sich das Ziel, vorevaluierte Resistenzquellen in Roggen gegen bodenbürtige Viren (Soil-borne cereal mosaic virus - SBCMV und Wheat spindle streak mosaic virus - WSSMV) im Detail zu charakterisieren und sie für die Entwicklung von Elitematerial zu erschließen. Im Rahmen des Projektes sollten bei den Projektpartnern JKI und KWS LOCHOW GMBH Resistenzprüfmethoden und Virusnachweis unter kontrollierten Bedingungen in den Zuchtbetrieben verbessert und gezielte Materialkreuzungen erstellt werden. Der Wissenschaftspartner vom JKI übernahm die Aufgaben der Evaluierung genetischer Roggenressourcen auf Virusresistenz und die Charakterisierung von Pathogenpopulationen hinsichtlich deren Einflusses auf die Resistenzreaktionen von Roggenformen. Der Wissenschaftspartner von der TUM übernahm die Aufgabe, für die Virusresistenz relevante Genombereiche zu identifizieren und gekoppelte Marker in spaltenden Nachkommenschaften zu kartieren und für die markergestützte Selektion bereitzustellen.

2. Voraussetzungen

Resistenzen gegen bodenbürtige Viren waren in den Roggensortimenten und im aktuellen deutschen Zuchtmaterial nicht bekannt. Aus diesem Grund wurden seit 2002 in Zusammenarbeit zwischen dem Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik (IRP) der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ) und den Zuchtbetrieben HYBRO GmbH und Lochow- Petkus GmbH Untersuchungen zur Epidemiologie an Roggen und zur Entwicklung von Infektions- und Selektionsmethoden für die Evaluierung genetischer Roggenressourcen mit Virusresistenz (InnoPlanta-Projekt FKZ 03I0645 A, 01. 10. 2004 bis 30. 06. 2006) durchgeführt. In einem weiteren Projekt zur Identifizierung von Resistenzquellen und zur Untersuchung der Genetik der Resistenz 2 gegen bodenbürtige Viren in Roggen und Triticale (01HS067 bzw. G01/04HS) in aktuellem Zuchtmaterial kooperierten die Projektpartner mit der Arbeitsgruppe Biotechnologie der Landessaatzuchtanstalt der

Universität Hohenheim. Im Rahmen der Kooperation zwischen dem BAZ-IRP und den Zuchtbetrieben Lochow-Petkus GmbH und HYBRO GmbH wurden erstmals Resistenzquellen in Zuchtmaterial und verschiedenen Sammlungspopulationen von Roggenherkünften nachgewiesen. Aus Vollgeschwisterfamilien bzw. aus spaltenden F₂-Populationen hervorgegangene Nachkommenschaften mit Virusresistenz konnten vermehrt werden, welche für die weitere Resistenzzüchtung und die Ziele des Forschungsvorhabens zur Verfügung standen.

Zu Projektbeginn gab es keine Erkenntnisse zu Majorgenen oder QTL für Virusresistenz in Roggen. Auch der Vererbungsmodus der oben beschriebenen Resistenzquellen war unbekannt. Für die molekularen Analysen standen rund 100 Mikrosatellitenmarker (SSRs) sowie weitere SSRs aus Weizen zur Verfügung, die teilweise öffentlich verfügbar waren oder vom Projektpartner KWS-LOCHOW GMBH zur Verfügung gestellt wurden.

3. Planung und Ablauf

Teilprojekt 3: Molekulargenetische Identifizierung der Virusresistenz und Erstellung molekularer Marker für die Resistenzzüchtung (Projektpartner Technische Universität München)

Der Projektpartner TUM sollte anhand der phänotypischen Daten aus spaltenden Nachkommenschaften die molekulargenetische Identifizierung der für die Virusresistenz relevanten Genombereiche mit Hilfe der Bulk Segregant Analyse (BSA; Michelmore et al. 1991) durchführen. Für die Markeranalysen standen Mikrosatelliten-Marker aus den Genomen von Roggen und anderen Triticeen (v.a. Weizen) zur Verfügung. Die Analyse der SSR-Marker erfolgte auf DNA-Sequencern, um eine gute Differenzierung der Markerallele zu erreichen. Da einige Genomregionen mit SSR-Markern nicht ausreichend abgedeckt werden konnten wurden zusätzlich AFLP-Analysen durchgeführt. Außerdem stellte der Projektpartner KWS-LOCHOW für zwei Populationen in der F₃ Generation SNP-Markerdaten zur Verfügung. Die statistische Auswertung der Daten erfolgt mit Standardsoftware (Excel) bzw. für die Kartierung mit JoinMap und PlabQTL / MapQTL.

Ziel der Arbeiten war die Erstellung von Kopplungskarten für drei spaltenden Nachkommenschaften in den Generationen F₃ und F₅. Nach den Analysen der phänotypischen Daten aus den ersten Versuchsjahren zeichnete sich ab, dass die Vererbung der Virusresistenz keinem monogenen Erbgang folgte und daher mit oligo- oder polygener Vererbung auszugehen war. Aus diesem Grund wurde keine BSA durchgeführt, da keine eindeutige Klassifizierung der Nachkommen in resistent und anfällig zur Zusammenstellung phänotypischer Pools möglich war. Dies bedeutete einen größeren Aufwand zur Erstellung von Kopplungskarten für das gesamte Genom in allen Kartierungspopulationen gegenüber der Zeit- und kosteneffizienten BSA-Analyse. Auf die Markeranalysen in der F₄ Generation wurde daher verzichtet. Zusammen mit den phänotypischen Daten, die vom Partner KWS-LOCHOW GMBH zur Verfügung gestellt wurden erfolgte die Kartierung von QTL für Resistenzen gegenüber bodenbürtigen Viren in Roggen in drei Kartierungspopulationen in jeweils zwei Generationen (F₃ und F₅).

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Da *Polymyxa graminis* als Vektor bodenbürtiger Getreideviren chemisch nicht bekämpft werden kann, ist der Anbau von Sorten mit Resistenz gegen die Furoviren SBCMV und SBWMV sowie das Bymovirus WSSMV die einzig wirksame Maßnahme zum Schutz der Kulturen (Proeseler und Kastirr 1988). Zum Nachweis und zur Charakterisierung von Resistenzquellen gegen das SBCMV und das WSSMV im Roggen waren bisher international keine Arbeiten publiziert. Detaillierte Studien zur Art der Resistenz in dieser Getreideart und deren Vererbung lagen nicht vor.

In Europa wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Marker für Resistenzgene gegen bodenbürtige Viren im Weizen identifiziert (Börner et al. 2002; Kanyuka et al. 2004, Bass et al. 2006). Erste Daten wiesen auf die Existenz eines Majorgens auf Chromosom 5DL des Weizens hin. In mehrjährigen Feldversuchen in Vatan (Frankreich) zeigte sich in der DH Population 'Tremie' x 'anfällig Sorten' ein Spaltungsverhältnis von 27r:37s, was auf eine monogene Vererbung hindeutete. Diese Ergebnisse konnten in einjährigen Analysen der 126 DH-Linien umfassenden Population 'Claire' x 'Savannah' bestätigt werden (69r:57s), so dass nach jetzigem Kenntnisstand von einer einfachen Vererbung der SBCMV-Resistenz auszugehen ist. Die 1:1-Aufspaltung in einer DH-Population ließ jedoch keinen Rückschluss auf den Vererbungsmodus (dominant oder rezessiv) der Resistenz zu. Basierend auf diesen phänotypischen Daten wurden unter Verwendung der 'bulk segregant analysis' (BSA) erste mit der SBCMV-Resistenz gekoppelte SSR-Marker identifiziert. Weitergehende Arbeiten zielten auf eine Identifikation enger gekoppelter Marker mittels der AFLP-Technik gefolgt von der Konvertierung in einfach zu handhabende STS-Marker ab, um damit die Voraussetzungen für eine effektive züchterische Nutzung der SBCMV-Resistenz zu schaffen (Perovic et al. 2005, 2006a, 2006b). Für die Identifizierung eines WSSMV-Resistenzgens im Weizen lagen bereits molekulare Marker vor (Khan et al. 2000). In klassischen Züchtungsprogrammen kann die Einlagerung von Resistenzgenen durch den Einsatz molekularer Marker effektiv kontrolliert werden (Ordon et al. 2003).

Erste umfangreiche Testungen von Sortimenten, Zuchtlinien und genetischen Ressourcen von Roggen zeigten, dass die geprüften Sortimente und Zuchtlinien keine Resistenz gegen bodenbürtige Viren besitzen (Kastirr et al. 2002a). Nach weiterer intensiver Evaluierung von genetischen Ressourcen des Roggens und von Zuchtmaterial der beteiligten Firmen wurden jedoch erstmals Resistenzquellen nachgewiesen. Durch Pärchenkreuzung befallsfreier selbstinkompatibler Einzelpflanzen aus Sammlungspopulationen genetischer Roggenressourcen konnten für Virusresistenz spaltende Populationen vermehrt werden, welche für eine nähere wissenschaftliche Charakterisierung und für die Resistenzzüchtung zur Verfügung standen (Kastirr et al. 2006). Weiterhin wurden selbstfertile Resistenzquellen aus den Zuchtprogrammen der Partner zu F₂-Populationen und F₃-Linien weiterentwickelt. Somit standen auch aus diesem Material spaltende Populationen zur Verfügung. Aus den im Rahmen des GFP-Projektes 01HS067 erstellten Kreuzungen lagen F₂-Nachkommenschaften vor, die für das vorgeschlagene Projekt genutzt werden konnten. Eine Verifikation der Resistenz dieses Materials unter Feldbedingungen stand noch aus.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Das Forschungsvorhaben wurde als Verbundprojekt der GFP zwischen den Wissenschaftspartnern des Julius Kühn-Instituts, Bundesforschungsinstitut für

Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik (JKI-EP) Quedlinburg (zu Beginn Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ), Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik) und der Technischen Universität München (TUM), Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt (WZW), Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung und dem Wirtschaftspartner KWS LOCHOW GMBH durchgeführt.

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse

Die Zuwendungen für Personalkosten und Verbrauchsmaterialien wurden im Rahmen der Mittelplanung für Untersuchungen der Forschungsschwerpunkte eingesetzt. Die Sachmittel wurden für umfangreiche molekulare Markeranalysen von Kartierungspopulationen verwendet.

1.1 Teilprojekt 3: Molekulargenetische Identifizierung der Virusresistenz und Erstellung molekularer Marker für die Resistenzzüchtung (Projektpartner Technische Universität München)

1.1.1 DNA-Extraktion und Identifizierung polymorpher Marker für die genetische Kartierung

Vom Projektpartner KWS-LOCHOW GMBH wurden von drei Kartierungspopulationen (Pop1, Pop2, Pop3; Tab. 1) und den zugehörigen Eltern Blattproben für die Markeranalysen in gefrorenem Zustand geliefert. Es handelte sich dabei jeweils um Mischproben aus bis zu 10 Einzelpflanzen, die damit jeweils den Genotyp der vorhergehenden Population rekonstituieren. Beispielsweise wird mit 10 F3 Pflanzen der Genotyp der zugrundeliegenden F2-Pflanze dargestellt. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff gemörsert und nach CTAB-Protokoll wurde DNA extrahiert und einer Qualitätskontrolle auf Agarosegelen unterzogen. Die DNA-Konzentration wurde auf einem BIOTEK EPOCH spektrometrisch bestimmt.

Tab. 1: Übersicht Kartierungspopulationen

Pop.	Elter 1	Elter 2	Anzahl F3/F4/F5 Nachkommen	Resistenzdonor SBCMV	Resistenzdonor WSSMV
Pop1	Lo115	Lo123	100	Elitelinie Lo123	-
Pop2	VGf* Moorroggen	Lo86	100	VGf Moorroggen	Elitelinie Lo86
Pop3	VGf BA2647	Lo310	100	VGf BA2647	VGf BA2647

* VGf: Vollgeschwisterfamilie

Nach Abschluss der DNA-Extraktion wurde mit dem Screening der Elternlinien auf Polymorphismen für SSR-Marker begonnen. Insgesamt wurden 149 genomweit verteilte SSR-Marker in allen drei Populationen auf Polymorphismus zwischen den Eltern untersucht. Bei

Pop2 ist unklar, warum der Polymorphiegrad im Elternscreening so niedrig lag. In vielen Fällen spalteten Marker, die für die Eltern polymorphe Banden zeigten in der Population nicht auf. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass der ursprünglich als Kreuzungselter verwendete Gamet nicht mehr zur Verfügung stand und daher eine Mischprobe aus mehreren Einzelpflanzen der Donorpopulation verwendet wurde. Dabei sind verständlicherweise zahlreiche falsch-positive sowie falsch-negative zu erwarten. Der insgesamt vergleichsweise niedrige Polymorphiegrad der SSR-Marker ist damit zu erklären, dass die meisten der verwendeten SSRs aus EST-Sequenzen abgeleitet sind, die in der Regel stärker konserviert sind als genomische SSR-Sequenzen.

Basierend auf den Erkenntnissen zur Kartierung von Resistenzgenen gegen SBCMV und WSSMV in Weizen wurde so weit möglich versucht, die den Weizenchromosomen der homöologen Gruppe 2 und 5 entsprechenden Chromosomen 2R, 5R und 7R gut abzudecken.

Um eine bessere Absättigung des Genoms zu erreichen wurden zusätzlich AFLP-Marker mit der Enzymkombination *PstI/MseI* eingesetzt. Für die Populationen Pop2 und Pop3, für die in der F3 Generation zunächst vergleichsweise wenige Marker zur Verfügung standen wurden vom Projektpartner KWS LOCHOW GMBH zusätzlich nach Projektende 384 an der TUM entwickelte Roggen SNP-Marker (Haseneyer et al. 2011) in einem Illumina VeraCode Assay analysiert und bereitgestellt. Die Gesamtzahl der in den einzelnen Populationen und Generationen verfügbaren Marker ist Tab. 2 dargestellt.

Da der Polymorphiegrad in Pop2 sehr niedrig war wurde im Laufe des Projekts entschieden, diese Population nicht in der F5 Generation zu untersuchen. Ebenfalls nicht mit Markern untersucht wurde in allen Populationen die Generation F4, da durch den gegenüber der ursprünglich geplanten Bulk Segregant Analyse deutlich erhöhten Aufwand für eine Gesamtgenom-Kartierung zeitliche und finanzielle Engpässe entstanden wären.

Tab. 2: Anzahl auswertbarer Marker in den einzelnen Populationen und Generationen

Marker	Population 1		Population 2		Population 3	
	F3	F5	F3	F5	F3	F5
SSR	30	28	7	-	24	23
AFLP	112	117	50	-	37	41
SNP	-	-	266	-	223	-
Gesamt	142	145	323	-	284	64

1.1.2. Erstellung genetischer Kopplungskarten

Es konnten für alle Populationen unter Verwendung der Software JoinMap 4 (VanOoijen 2006) Kopplungskarten für die F3 bzw. F5 Generation erstellt werden, die das Roggengenom jedoch nicht komplett abdecken (Tab. 3, Abb1., Abb.2, Abb. 3). In den meisten Fällen ist die Zuordnung der Kopplungsgruppen zu den sieben Roggenchromosomen über SSR- bzw. SNP-Marker erfolgt, für die Kartierungsdaten aus anderen Studien vorlagen. Für eine Kopplungsgruppe in Pop3, die ausschließlich aus AFLP-Markern besteht war keine chromosomale Zuordnung möglich. Für einige Chromosomen gibt es darüber hinaus mehrere kleinere, ungekoppelte Kopplungsgruppen (A-E), die in ihrer Lage zueinander jedoch meist zugeordnet werden konnten. Nicht alle ursprünglich als polymorph