

Wege zur Nutzung des genetischen Potentials der Wildgerste - mit molekularen Markern zu neuen Resistenzgenen

G. BACKES und A. JAHOR

Einleitung

Heute erwartet man von landwirtschaftlichen Produkten nicht nur, dass sie qualitativ hohe Standards erfüllen, sie sollen darüber hinaus möglichst auch umweltschonend produziert sein. Darüber hinaus setzen die zu erreichbaren Absatzpreise im Falle von Getreide dem möglichen Aufwand zur Erzielung des gewünschten Ertrags und der geforderten Qualität enge Grenzen. Im Falle eines Krankheitsbefall durch pilzliche Parasiten ergibt sich somit ein Zielkonflikt für den Landwirt: setzt er Fungizide ein, erhöht er den finanziellen Aufwand und verringert die Umweltverträglichkeit seiner Produktion. Verzichtet er auf Fungizide, so muss er sich mit verminderter Qualität und geringerem Ernteertrag begnügen.

Resistenzzüchtung ist der beste Weg zur Lösung dieses Dilemmas und nimmt den Pflanzzüchter in die Pflicht, durch seinen Beitrag sowohl das Einkommen des Landwirts zu sichern als auch die gesellschaftlichen Forderungen an Produktion und Produkt zu erfüllen.

In Dänemark ist Gerste eine der wichtigsten Kulturpflanzen. Zu den wichtigsten Blattkrankheiten in Gerste gehören der Mehltau, verursacht durch den Pilz *Blumeria graminis* D.C. f.sp. *hordei*, und Zwergrost, verursacht durch den Pilz *Puccinia hordei*.

Die Wildgerste als Resistenzdonor

Züchtung für Resistenz gegen pilzliche Schaderreger ist ein kontinuierlicher Prozess, da der Erreger sich mehr oder weniger schnell an die Resistenz der Pflanze anpasst, die dadurch ihre Wirkung verliert. Daher ist die Zugänglichkeit neuer Resistenzquellen wichtig für die

Bereitstellung neuer Sorten. Diese können nicht in ausreichendem Maße aus dem Genpool der Kulturgerste bezogen werden. Daher gewinnt der durch verwandte Wildarten ausgeweitete Genpool eine große Bedeutung bei der Suche nach neuen und effektiven Resistenzgenen. Zum primären Genpool der Kulturgerste gehört neben der Kulturgerste, *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* auch die Subspezies "spontaneum", im folgenden vereinfachend als "Wildgerste" bezeichnet. Innerhalb dieses primären Genpools sind Kreuzungen und damit Gentransfer unproblematisch. Der sekundäre Genpool, in dem Kreuzungen problematisch sind, wird durch *Hordeum bulbosum* gebildet. Andere Wildgerstenarten formen den tertiären Genpool (BOTHMER et al., 1992). Die enge Verwandtschaft der Subspezies *Spontaneum* mit der Kulturgerste lässt sich auch über markerbasierte genetischen Diversität

nachweisen (LAINÉ et al., 2000). Darüber hinaus ist die genetische Diversität innerhalb der Subspezies *Spontaneum* deutlich höher als innerhalb der Kulturgerste (Abbildung 1). Damit ist sie die ideale Quelle für Resistenzgene, die in Kulturgerste Verwendung finden können.

Qualitativ wirkende Mehlauresistenzgene aus Wildgerste

Während Wildgerstelinien aus Israel eine relativ hohe Anfälligkeit gegenüber israelischen Mehlauisolaten aufweisen, was durch eine lange Ko-Evolution von Wirt und Parasit erklärt werden kann, zeigen sie in den allermeisten Fällen eine resistente bis intermediäre Reaktion gegenüber europäischen Mehlauisolaten. (Abbildung 2). Das zeigt, dass die Suche nach Resistenzgenen in diesem Material erfolgversprechend sein sollte.

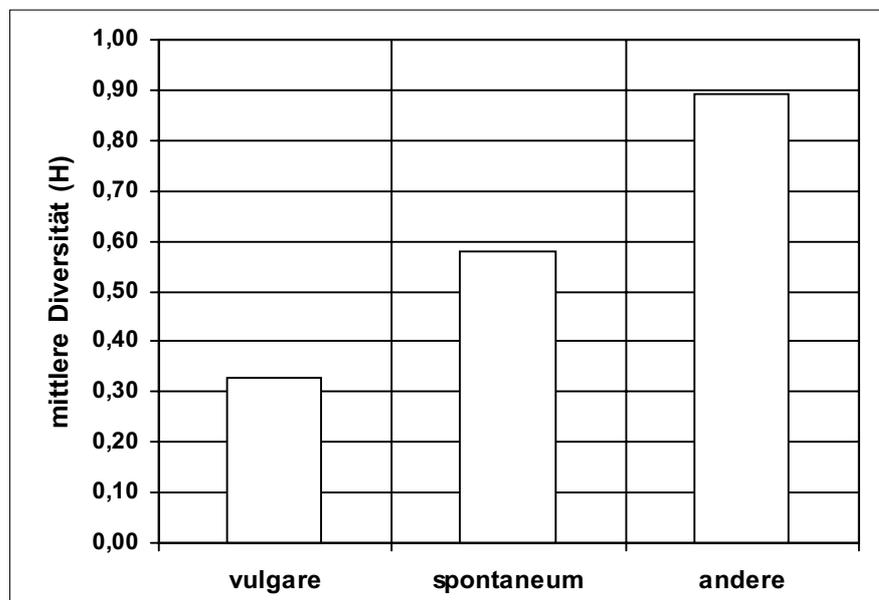


Abbildung 1: Mittlere genetische Diversität innerhalb von *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*, *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* und anderen Wildgersten. Daten basieren auf 32 RFLP-Markern und insgesamt 223 Linien

Autoren: Dr. Gunter BACKES und Dr. Dr. habil. Ahmed JAHOR, Forskningscenter Risø, Afd. for Planteforskning, PRD-330, DK-4000 ROSKILDE



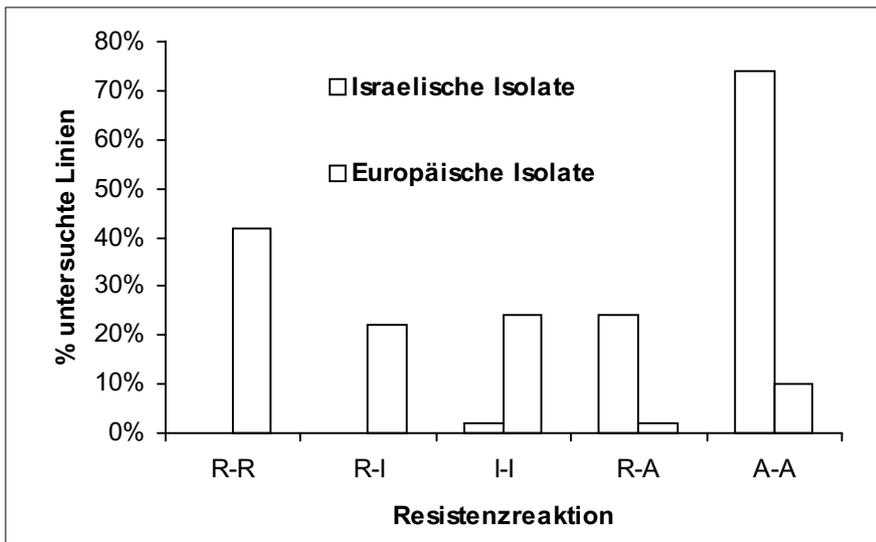


Abbildung 2: Reaktion von 22 Wildgerstenlinien mit europäischen und israelischen Wildgerstenisolaten (R-R = durchgehend resistent, R-I = teilweise resistent, teilweise intermediär, I-I = durchgehend intermediär, R-A = teilweise resistent, teilweise anfällig, A-A = durchgehend anfällig)

Dass dies auch tatsächlich zutrifft zeigt der hohe Anteil qualitativ vererbter Mehlauresistenzgene aus Wildgerste (Abbildung 3). Für dem *Mla*-Lokus auf dem Gerstechromosom 1H wurden 17 Allele für Resistenz aus der Subspezies *Spontaneum* gefunden (JAHOOR and FISCHBECK, 1993). Auf Chromosom 5H wurde der aus Wildgerste stammen-

de Resistenzlokus *Mlj* lokalisiert (SCHÖNFELD et al., 1996). Auf Chromosom 7H schließlich liegen die aus der Wildgerste stammenden Resistenzloci *Mlt* und *Mlf* mit bisher 3 bzw. 4 Resistenz vermittelnden Allelen (SCHÖNFELD, 1997).

Um diese Resistenzquelle für die praktische Gerstenzüchtung nutzbar zu ma-

chen, wurden in den Jahren 1987 bis 1996 11 Sommergerstenlinien (SI-1 bis SI-11, s. Tabelle 1) und 10 Wintergerstenlinien (WI-1 bis WI-10, s. Tabelle 2) an die Deutschen Pflanzenzüchter verteilt. Die Sommergerstenlinien waren vier- bis fünfmal mit verschiedenen Kulturgerstensorten rückgekreuzt und enthielten Resistenzgene vom *Mla*-, *Mlf*-, *Mli*-, *Mlj*- und *mlt*-Lokus, sowie nicht lokalisierte Resistenzgene. Die WI-Linien waren drei- bis viermal rückgekreuzt und besaßen Resistenzgene vom *Mla*-Lokus und ebenfalls nicht lokalisierte Resistenzgene.

Der Erfolg dieser Strategie zeigt sich darin, dass in den Jahren 1997 bis 2001 8 Deutsche Sorten zugelassen wurden (Tabelle 3): "Camilla" mit der Resistenz aus RS1-12, die sich auch in SI-1 findet, "Peggy", "Baccara" und "Sally" mit der Resistenz aus SI-1, "Roxana" mit der Resistenz aus 1B-53, "Vrena" mit der Resistenz aus WI-1 und schließlich "Alabama" und "Philadelphia" mit der Resistenz aus SI-8. Die strenge Trennung zwischen Resistenzgenen in Sommer- und Wintergerste, deren Beibehaltung Bedingung für den Erhalt der Resistenzlinien war, sichert ein gezieltes Resistenzmanagement.

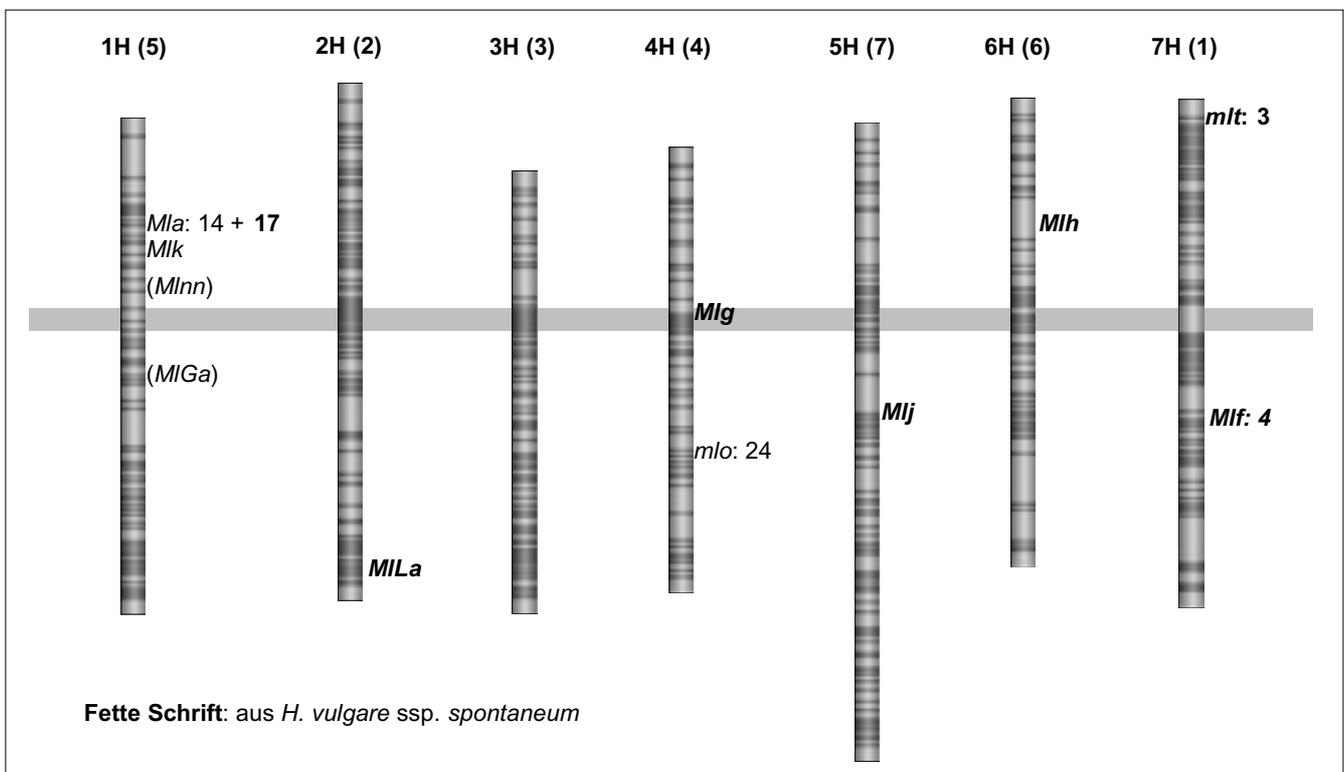


Abbildung 3: In Gerste lokalisierte qualitative Mehlauresistenzgene. Resistenzgene aus Wildgerste sind gesondert gekennzeichnet. Die Banden auf den Chromosomen entsprechen Markerpositionen der „Barley Consensus Map“

Tabelle 1: Verteilung von Linien mit neuen Mehlttauresistenzgenen für Sommergerste an Deutsche Gerstenzüchter

Linie	Jahr	Donor	Rückkrzgen.	Resist.-lokus
SI-1	1987	RS1-12	5	Mla
SI-2	1987	RS81-B-10	5	Unbekannt
SI-3	1989	1-B-86	5	Mla
SI-4	1989	1-B-87	4	Mlf+mit
SI-5	1992	RS160-47	5	Gekoppelt mit Mla
SI-6	1992	RS-164-6	5	Mlf+mit
SI-7	1992	RS14-C-24	4	Mla
SI-8	1996	RS42-8	5	Mli
SI-9	1996	RS42-6	5	Mlt
SI-10	1996	RS137-28	5	Mlf
SI-11	1996	HSY-78	5	Mlj

Tabelle 2: Verteilung von Linien mit neuen Mehlttauresistenzgenen für Wintergerste an Deutsche Gerstenzüchter

Linie	Jahr	Donor	Rückkrzgen.	Resistenz-lokus
WI-1	1988	Rs-142-29	4	Mla
WI-2	1988	RS20-2	3	Unbekannt
WI-3	1989	L74-11	4	Unbekannt
WI-4	1989	RS2-2	4	Mla
WI-5	1989	RS111-1	4	Unbekannt
WI-6	1992	RS132-45		Nicht Mla
WI-7	1992	RS122-19	4	Unbekannt
WI-8	1992	RS170-A-S	4	Unbekannt
WI-9	1996	RS70-29	4	Mla
WI-10	1996	RS70-30	4	Unbekannt

Tabelle 3: Zugelassene Sorten mit neuen, aus Spontaneum stammenden Mehlttauresistenzgenen

Sorte	Züchter	Zulassung	Resistenzquelle
Camilla	Streng	1997	RS1-12
Peggy	Streng	1998	SI-1
Baccara	Schweiger	1998	SI-1
Sally	Streng	1999	SI-1
Roxana	Breun	1998	1-B-53
Vrena	Nordsaat	2000	WI-1
Alabama	Lochow-Petkus	2000	SI-8
Philadelphia	Lochow-Petkus	2001	SI-8

Da mittlerweile über 600 Mikrosatelliten-Marker für Gerste verfügbar sind, von denen über die Hälfte kartiert sind (RAMSAY et al., 2000), ist es relativ wahrscheinlich, dass man für eine gegebene Position im Genom entsprechende Marker findet. Damit können molekulare Marker einen wichtigen Beitrag zur Übertragung von qualitativen Resistenzgenen aus Wildgerste leisten.

Quantitativ wirkende Mehlttauresistenzgene aus Wildgerste

Quantitative Resistenz ist - im Gegensatz zur qualitativen Resistenz durch einen mehr oder weniger kontinuierlichen Übergang von anfälligen zu resistenten Genotypen in einer spaltenden Population gekennzeichnet. Von dieser Art Resistenz erwartet man, dass sie weniger schnell vom Pathogen durchbrochen wird, da der Selektionsdruck auf den Krankheitserreger geringer ist und zum Teil andere Resistenzmechanismen wirksam sind als bei qualitativen Resistenzen.

Am Beispiel der Wildgerstenlinie "1B-87" soll hier gezeigt werden, dass Wildgerste nicht nur ein wichtiger Quelle für

qualitative, sondern auch quantitative Resistenzgene ist. Aus der Kreuzung von "1B-87" mit der zweizeiligen Sommergerste "Vada" wurden 121 RI ("recombinant inbreds")-Linien erzeugt. In dieser spaltenden Population wurden 376 Markerbanden untersucht und eine Karte mit 221 Markerloci erstellt (Abbildung 4). Neben 58 RFLP-Loci, 16 SSR-Loci und 134 AFLP-loci umfasst diese Karte ebenfalls 13 RGA ("Resistance Gene Analog")-Loci (S... in Abbildung 4). Die Entwicklung der RGAs wurde von Lene H. Madsen und Jens Stougaard an der Universität Århus, Institut für Molekulare und Strukturelle Biologie, durchgeführt (MADSEN et al., persönl. Mittlg.) Zur Entwicklung dieser RGA-Marker wurden, ausgehend von publizierten Sequenzen von Resistenzgenen des NBS-LRR-Typ, degenerierte Primer erstellt. Diese Primer entsprechen gemeinsamen Motiven dieser Resistenzgene (STASKAWICZ et al., 1995) und dienten zur Amplifikation von Fragmenten aus der Sorte "Regatta". Die entsprechenden Gene in "Regatta" wurden sequenziert, auf Aktivität überprüft und es wurden Primer entwickelt, die in "1B-87" und "Vada" Unterschiede zeigen.

Mehltauresistenz wurde zum einen in einem Feldversuch von Heidi Jaiser, auf der Züchtungsstation Pajbjergfonden, Dänemark, untersucht. Dabei wurden zwei Beobachtungen durchgeführt, eine zum Beginn der Infektion und eine zweite im Höhepunkt der Krankheitsentwicklung. Zum anderen wurde die Mehlttauresistenz auf Keimblättern in einem Schalentest mit dem Isolat "Va-4" getestet, das Resistenz gegen die *Mla*-Resistenz besitzt, die "Vada" einbringt. Dieser Test wurde von Markus Herz am Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der TU-München-Weihenstephan durchgeführt. Die Resistenz gegen Zwergrost in der spaltenden Population wurde ebenfalls von Heidi Jaiser überprüft. Dazu kam das Rostisolat "I-80" in einem modifizierten Protokoll nach WALTHER (1991) zum Einsatz. Dabei wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen Bonituren durchgeführt, die Fläche unter der Infektionskurve (AUDPC) berechnet und in Relation zu "Vada" gesetzt. Da die Verteilung der Werte innerhalb der Population keine Normalverteilung zeigt und durch die ganzzahligen Bonituren eine gewisse Diskontinuität aufwies, wurde eine nichtparametrische QTL-Analyse durchgeführt. Dabei wurden QTLs mit einer individuellen Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,0005 akzeptiert.

Unter den beschriebenen Bedingungen wurden für die Mehlttauresistenz im Feldversuch QTLs auf 1H, 2H, 4H und 7H gefunden. Der Unterschied zwischen den beiden Nachkommengruppen, die entweder beide Allele vom resistenten oder vom anfälligen Eltern hatten war für den QTL auf 1H 1,1 Boniturspunkte, für den QTL auf 2H 1,5 Boniturspunkte und für den QTL auf 7H 1,2 Boniturspunkte. Für den QTL auf 2H ist "Vada" der resistente Elter, für die beiden anderen QTLs steuerte "1B-87" das resistente Allel bei.

Wurde die Mehlttauresistenz im Schalentest für die QTL-Analyse herangezogen, so wurden 2 QTLs detektiert, auf 3H und 7H, wobei der QTL auf 7H identisch mit dem QTL ist, der im Feld gefunden wurde. Der Unterschied zwischen Mittel der Nachkommenslinien mit dem Allel des resistenten Elters (in beiden Fällen "1B-87") und dem der Linien mit dem Allel

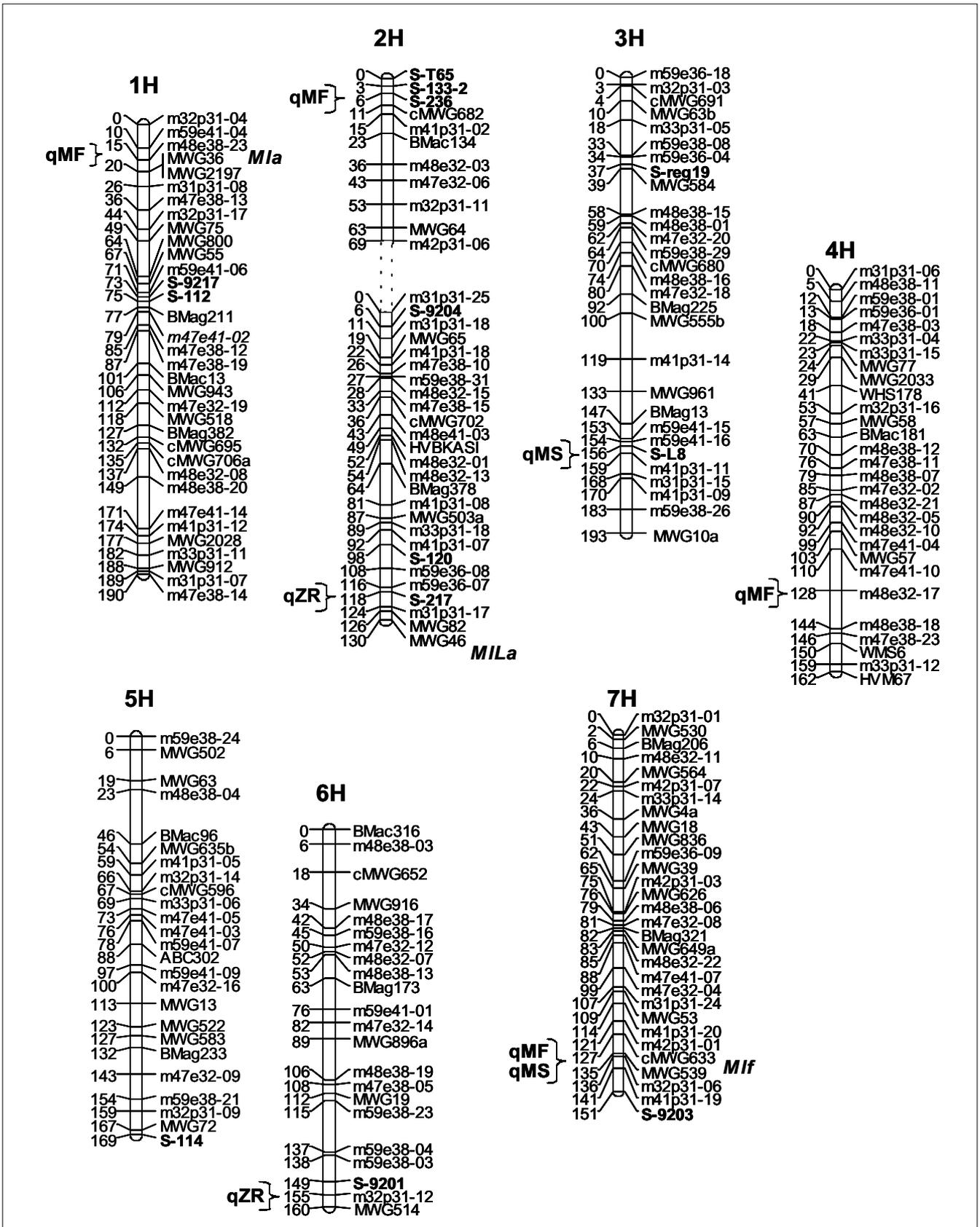


Abbildung 4: Kopplungskarte der Kreuzung „1B-87“ x „Vada“ mit Markernamen auf der rechten Seite der Chromosomen und Markerposition auf der linken Seite der schematischen Chromosomen. RGA's erscheinen im Fettdruck. Auf der linken Seite der Chromosomen sind die relativen Positionen der QTLs markiert (qMF = QTL für Mehltauresistenz im Feld, qMS = QTL für Mehltauresistenz im Schalentest, qZR = QTL für Zwergrostresistenz). Auf der rechten Seite der Chromosomen sind außerdem relevante qualitative Mehltauresistenzen markiert

des anfälligen Elters ist 3,1 Boniturstufen für den QTL auf 3H und 3,2 Boniturstufen für den QTL auf 7H.

Eine QTL-Analyse des Schalentests für Gelbrosts ergab zwei QTLs, einen auf 2H und einen auf 6H, beide mit der Wildgerste als resistentem Elter. Die Unterschiede zwischen dem Mittel der Nachkommen mit beiden Allelen von "1B-87" bzw. "Vada" betragen 52% für den QTL auf 2H bzw. 71%. Für den QTL auf 6H.

Ein großer Teil der lokalisierten QTLs konnte entweder zusammen mit RGA-Loci (Mehltauresistenz-QTLs auf 2H und 3H, Zwergrostresistenz-QTLs auf 2H und 6H) oder auf Positionen bekannter qualitativer Resistenzgene (Mehltauresistenz-QTLs auf 1H und 7H) lokalisiert werden. Da die den RGA's zu Grunde liegenden Resistenzgene ebenfalls qualitativ sind, ist das ein Hinweis auf das enge Verhältnis von qualitativen und quantitativen Resistenzgenen, was Beobachtung in anderen Spezies mit anderen Krankheiten bestätigt (KELLER et al., 1999, GEFFROY et al., 2000). Eine mögliche Erklärung ist, dass einige QTLs milde oder nicht mehr voll wirksame Allele qualitativer Resistenzen sind (LI et al., 1999).

Damit konnte gezeigt werden, dass *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* nicht nur

ein bedeutendes Potential für qualitative Resistenzgene darstellt, sondern auch den Genpool der Kulturgerste für quantitative Resistenzen erweitern kann. Molekulare Marker können helfen, Genotypen mit den gewünschten Resistenzgenen bzw. der gewünschten Kombination von Resistenzgenen zu selektieren. Kenntnis über die Lokalisierung dieser Resistenzgene gibt Aufschluss über die Erfolgsaussichten einer möglichen Kombination. Damit steht dem Aufbau einer effektiven, multigenischen Resistenz durch Pyramidierung von quantitativen und qualitativen Resistenzgenen nichts mehr im Wege.

Literatur

- BOTHMER, VON R., O. SEEGER and N. JACOBSEN, 1992: Genetic resources in the Triticeae. *Hereditas* 116: 141 - 150.
- GEFFROY, V., M. SEVIGNAC, J.F.C. DE OLIVEIRA, G. FOUILLOUX, P. SKROCH, P. THOQUET, P. GEPTS, T. LANIGN and M. DRON, 2000: Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Mol. Plant-Microbe Interaction* 13: 287 - 296.
- JAHOR A. and G. FISCHBECK, 1993: Identification of new genes for mildew resistance of barley at the Mla Locus in *Hordeum spontaneum* derived lines. *Plant Breeding* 110, 116 - 122.
- KELLER, M., B. KELLER, G. SCHACHERMAYR, M. WINZELER, J.E. SCHMIDT, P. STAMP and M.M. MESSMER, 1999: Quantitative trait loci for resistance against powdery mildew in a segregating wheat spelt population. *Theor. Appl. Genet.* 98: 903 - 912.
- LI, Z.-K., L.J. LUO, H.W. MEI, A.H. PATERSON, X.H. ZHAO, D.B. ZHONG, Z.P. WANG, X.Q. ZU, L. ZHU, R. TABIEN, J.W. STANSEL and C.S. YING, 1999: A "defeated" rice resistance gene acts as a QTL against a virulent strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular and General Genetics* 261: 58 - 63.
- RAMSAY, L., M. MACAULAY, S. DEGLI IVANNISSEVICH, K. MACLEAN, L. CARDEL, J. FULLER, K.J. EDWARDS, S. TUVESON, M. MORGANTE, A. MASSARI, E. MAESTRI, N. MARMIROLI, T. SJAKSTE, M. GANAL, W. POWELL and R. WAUGH, 2000: A Simple Sequence Repeat-Based Linkage Map of Barley. *Genetics* 156: 1997 - 2005.
- SCHÖNFELD, M., 1997: Identifizierung und molekulare Lokalisierung neuer Resistenzgenloci der Wildgerste (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) gegen Mehltau (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). Dissertation TU-München.
- SCHÖNFELD, M., A. RAGNI, G. FISCHBECK and A. JAHOR, 1996: RFLP mapping of three new loci for resistance genes to powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) in barley. *Theor. Appl. Genet.* 93: 48-56.
- STASKAWICZ, B.J., F.M. AUSUBEL, B.J. BALLIS, J.G. ELLIS and J.D.G. JONES, 1995: Molecular-genetics of plant-disease resistance. *Science* 258: 661-667.
- WALTHER, U., 1991: Evaluierung der Gaterslebener Gerstenkollektion auf Resistenz gegen Zwergrost (*Puccinia hordei* Otth) und Nutzung der Ergebnisse in der Winter- und Sommergerstenzüchtung. Bericht Arbeitstagung Gumpenstein 42: 243-246.

