

Entwicklung molekularer Marker bei Gerste gegen pilzliche Schaderreger

M. NACHTIGALL, M. SAKER, D. KOPAHNKE und U. WALTHER

Einleitung

Neben der Erhöhung des Ertrages und der Qualität stellt die Verbesserung bzw. Stabilität der Resistenz gegenüber Schaderregern ein wichtiges Zuchtziel bei der Gerste dar.

Im mitteleuropäischen Raum zählt der Zwergrost (*Puccinia hordei* Otth.) neben dem Gerstenmehltau (*Blumeria graminis f.sp. hordei* March.) sowie der Netzfleckenkrankheit (*Pyrenophora teres* Sacc. Shoemaker) zu den wirtschaftlich bedeutenden Blattpathogenen. In den letzten Jahren konnte durch eine erfolgreiche Gerstenzüchtung das Resistenzniveau gegenüber diesen Schaderregern zwar deutlich gesteigert werden, jedoch ist infolge der Selektion neuer Pathogenvirulenzen oder Virulenzgenkombinationen eine breite genetische Grundlage für eine hohe Stabilität der Resistenz entscheidend. So ist beim Zwergrost zurzeit in Europa nur noch ein Majorgen, das *Rph 7* Gen, wirksam. Daher besteht ständiger Bedarf an neuen wirksamen Resistenzgenen für die Resistenzzüchtung sowohl bei Sommer- als auch Wintergerste.

Die Chance im Genpool der Kulturgerste neue, wirksame Resistenzen zu finden, wird als gering eingeschätzt (GRÄNER et al. 1999). Daher wurde in den letzten Jahren verstärkt dazu übergegangen, umfangreiche Evaluierungsarbeiten auch an Wild- und Primitivformen, wie z.B. *H. vulgare* ssp. *spontaneum*, durchzuführen und in diesem Material nach neuen Resistenzträgern zu suchen.

Nach ersten Einschätzungen bietet das evaluierte *H. spontaneum* Material gute Voraussetzungen für die Züchtung neuer resistenter Gerstensorten und kann zur Verbreiterung des Resistenzspektrums und einer stabilen Resistenz im zugelassenen Gerstensortiment beitragen (WALTHER et al. 1999). Voraussetzung

dafür ist eine Bestimmung und Charakterisierung der relevanten Gene, wobei molekulare Marker hierzu wichtige und hilfreiche Werkzeuge sind.

Forschungsziele

Die Arbeiten zur Entwicklung molekularer Resistenzmarker bei Gerste konzentrieren sich im wesentlichen auf folgende Ziele:

⊗ Die Identifizierung und molekulare Kartierung neuer Resistenzloci in *H. spontaneum* Herkünften mittels enggekoppelter Marker (AFLP's, RAPD's, SSR's)

- Die Konvertierung dieser Marker in praxisrelevante PCR-Marker
- Den Einsatz als diagnostische Marker zur effektiven Identitätsbestimmung von Resistenzgenen bei der Evaluierung genetischer Ressourcen

Die Einlagerung von Resistenzen speziell aus Wild- bzw. Primitivformen in Kulturformen erfordert langwierige Rückkreuzungsprogramme, wobei durch eine gezielte markergestützte Selektion im Zuchtprozess diese Zeit effektiv verkürzt werden kann.

Die in der BAZ entwickelten molekularen Marker sollen den Züchtern übergeben werden und bilden somit die Grundlage für eine schnelle Einlagerung von Resistenzen in das aktuelle Zuchtmaterial.

Material

Gerste / Zwergrost

Im Institut für Epidemiologie und Resistenz wurde ein 500 Sippen umfassendes Sortiment von *H. spontaneum* hinsichtlich des Resistenzverhaltens gegenüber Zwergrost evaluiert. Im Ergebnis dieser Analysen konnten 40 Sippen selektiert werden, die gegen alle in Euro-

pa auftretenden Zwergrostisolate resistent waren (PROCHNOW 1998). Eine Prüfung dieser Sippen mit *Rph 7* virulenten Isolaten in Israel ergab, dass diese Resistenz nicht auf dem *Rph 7* Gen beruht und somit neue Resistenzgene in dem Material zu erwarten sind.

Einige der selektierten Sippen weisen neben der Zwergrostresistenz noch Resistenz gegen Mehltau, Gelbrost oder Netzflecken auf und dürften für die Züchtung von besonderem Interesse sein.

Die resistenten *H. spontaneum* Linien wurden generell mit der anfälligen Linie L94 gekreuzt und anhand der Spaltungsverhältnisse die Vererbung der Resistenz analysiert.

So wurde bei den Kreuzungen L 94 x *H. spontaneum* 680 und L 94 x *H. spontaneum* 725 in den F₂-Nachkommenschaften ein Spaltungsverhältnis von 1:3 beobachtet. Diese Ergebnisse belegen einen monogenen Erbgang, wobei die Zwergrostresistenz auf ein rezessives Gen zurückzuführen ist. Dieses Gen wurde als *rph16* bezeichnet und auf Chromosom 2HS kartiert. Für eine markergestützte Selektion steht ein PCR-Marker zur Verfügung, der mit dem *rph16*-Gen cosegregiert (IVANDIC et al. 1998). Die durchgeführten molekularen Analysen und entsprechende Identitätskreuzungen der *H. spontaneum* Sippen untereinander lassen den Schluss zu, dass sowohl in *H. spontaneum* 680 als auch in *H. spontaneum* 725 das gleiche Gen (*rph16*) für die Resistenz verantwortlich ist.

Weitere Vererbungsanalysen an Kreuzungen von L94 mit den *H. spontaneum* Linien 579, 584, 689, und 677 ergaben in der F₂-Population ein Spaltungsverhältnis von 3:1, was wiederum auf eine monogen bedingte Resistenz, verursacht durch ein dominantes Gen, hindeutet.

Autoren: Dr. Marion NACHTIGALL, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ), Institut für Resistenzforschung und Pathodiagnostik, D-06449 ASCHERSLEBEN, Dr. Doris KOPAHNKE, BAZ, Institut für Epidemiologie und Resistenz, D-06449 ASCHERSLEBEN, Dr. Mahmoud SAKER, National Research Centre, CAIRO, Egypt, Dr. Ursula WALTHER, Plantstr. 15, D-39398 HADMERSLEBEN



Bei der *H. spontaneum* Linie 677 kann davon ausgegangen werden, dass es sich weder um eine *Rph 7* noch um eine *rph16* bedingte Zwergrostresistenz handelt (WALTHER et al. 1999).

Für unsere molekularen Untersuchungen standen uns 75 DH-Linien einer Kreuzung aus *H. spontaneum* 677 x 'Krona' sowie 200 DH-Linien der Kreuzung (*H. spontaneum* 677 x 'Krona') x 'Scarlett' zur Verfügung.

Gerste / Netzflecken

Genetische Analysen nach Kreuzung von *H. spontaneum* mit den anfälligen Sorten 'Compana' 'Karat' und 'Femina' ergaben, dass relativ wenige Gene an der Resistenz gegenüber *P. teres* beteiligt sind.

Ausgehend von den Spaltungsverhältnissen der F2-Populationen muss in den *H. spontaneum* Linien 680 und 145 jeweils von einem rezessiven und einem dominanten Gen ausgegangen werden, während bei *H. spontaneum* 650 eine monogene Vererbung, basierend auf einem dominanten Resistenzgen nachgewiesen werden konnte.

75 DH-Linien der Kreuzungspopulation *H. spontaneum* 650 x 'Femina' bilden die Basis für die Markeranalysen.

Methoden

F2-Populationen bzw. DH-Linien wurden mit definierten Erregerisolaten inokuliert und ihre Resistenzreaktion auf der Grundlage spezieller Boniturschemata beschrieben. Parallel dazu wurde von den untersuchten Einzelpflanzen Blätter entnommen und die genomische DNA nach Gefriertrocknung und Homogenisation des Blattmaterials in einer Kugelmühle nach der von SAGHAI MAROOF et al. (1984) beschriebenen CTAB-Methode isoliert.

Für die RAPD-Untersuchungen wurden verschiedene Dekamer Random Primer Kits (Firma Roth) eingesetzt. Ferner wurden 60 Mikrosatelliten-Primer aus der Bmac-, Ebmac- und HVM-Familie getestet. Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte erfolgte im Acrylamidgel, die DNA-Fragmente wurden anschließend mit Silbernitrat gefärbt. Für die RFLP-Analysen wurde die genomische DNA mit Restriktionsenzymen

(BamHI, DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, XbaI) geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulose geplottet und mit 32P-markierten DNA-Sonden hybridisiert. Die Auswertung erfolgte anhand positiver Signale auf einem Röntgenfilm.

Die AFLP-Methode wurde in Anlehnung an das von der Firma Keygene entwickelte Verfahren (VOS et al. 1995) nach simultaner Restriktion mit den Enzymen EcoRI und MseI durchgeführt. Die EcoRI Primer wurden Cy5 markiert, die Analyse der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgt am ALFexpress.

Ergebnisse

Markeranalysen Gerste / Zwergrost

Die Mikrosatellitenprimer wurden in einer Bulk Segregant Analyse auf vorhandene Polymorphismen zwischen den Kreuzungseltern (L 94, *H. spontaneum* 677) und den bulks getestet. Bei drei Primern wurden polymorphe Banden beobachtet, die auf eine Kopplung zum Resistenzlocus hinweisen. So konnte bei dem Primerpaar Ebmac0521 ein polymorphes DNA-Fragment in der resistenten Mutter (*H. spontaneum* 677) und im resistenten bulk nachgewiesen werden. Die Analyse der 75 DH-Linien ergab in 80 % der Fälle eine Übereinstimmung des Markers mit dem Phänotyp (Abbildung 1). Aus der benachbarten Region des auf Chromosom 2H kartierten Ebmac0521-Markers wurden weitere SSR-Primer getestet. Auch bei Ebmac0558 und Ebmac0557 konnte eine Kopplung zum Resistenz-

gen beobachtet werden. Weitere Untersuchungen sollen dazu beitragen, den Markerabstand zum Resistenzlocus zu verringern.

Ferner wurden 50 RAPD-Primer auf Polymorphismen zwischen den Kreuzungseltern untersucht. Dabei erwies sich der Primer OPB07 bisher als aussichtsreich, wobei weitere Einzelpflanzenanalysen dieses Ergebnis noch bestätigen müssen.

Die RFLP-Analysen zeigten nach Hybridisierung mit der Sonde MWG 520 bei den HindIII und DraI geschnittenen Proben einen deutlichen Polymorphismus zwischen den Eltern und den bulks, der nach Analyse der DH-Linienpopulation jedoch keine Kopplung mit dem Merkmal Resistenz erkennen lässt. Nach Etablierung der AFLP-Methode im Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik wurden mehr als 200 verschiedene Primerkombinationen auf ihren Polymorphiegrad untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu den SSR's und RAPD's aufgrund der Komplexität der Bandenmuster mit diesem Verfahren weitaus mehr Polymorphismen zwischen den Kreuzungspartnern detektiert werden können. Bei der Kreuzungspopulation *H. spontaneum* 677 x 'Krona' konnte bisher bei zwei Primerkombinationen (E39M58-470 bp, E37M33-350 bp) ein polymorphes DNA-Fragment beobachtet werden, dass sowohl für die resistente Mutter als auch den resistenten bulk charakteristisch ist, jedoch nicht bei allen resistenten DH-Linien nachgewiesen werden konnte. Das bei dem Primerpaar

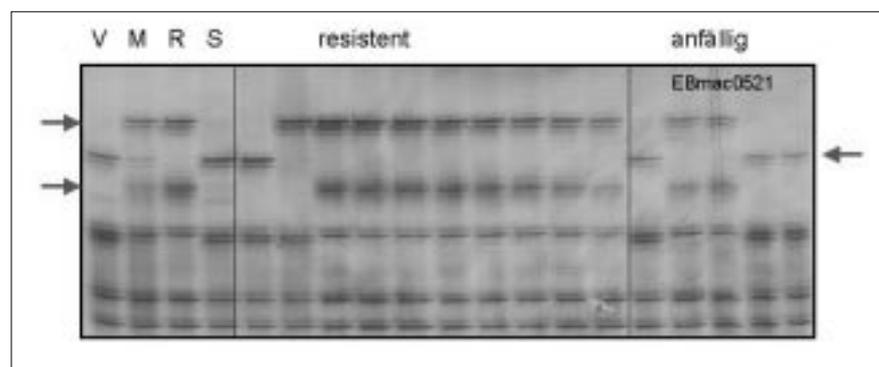


Abbildung 1: SSR-Analyse einer DH-Linienpopulation der Kreuzung *H. spontaneum* 677 x 'Krona' V - 'Krona' (anfällig), M - *H. spontaneum* 677 (resistent), R - resistenter bulk, S - anfälliger bulk Polymorphismen durch Pfeile gekennzeichnet

E37M33 detektierte 350 bp große DNA-Fragment wurde bei 80 % der resistenten DH-Linien amplifiziert (Abbildung 2).

Da aber auch bei 20 % der anfälligen Pflanzen dieser Marker beobachtet werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass die Distanz zum Resistenzlocus noch zu groß ist. Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen

sind daher weiterführende Untersuchungen zwingend notwendig.

Markeranalysen Gerste / Netzflecken

In der Kreuzungspopulation *H. spontaneum* 650 x 'Femina' wurde unter Verwendung einer MWG-Sondenkollektion nach RFLP-Markern gesucht. Basierend auf einer Bulked Segregant Analyse

konnte bei den BamHI-, DraI- und EcoRI-geschnittenen Proben nach Hybridisierung mit den DNA-Sonden MWG 896 und MWG 837 ein deutlicher Polymorphismus zwischen den Eltern und den bulks beobachtet werden. Die Untersuchungen einzelner DH-Linien zeigten, dass mit der DNA-Sonde MWG 896 zwischen anfälligen und resistenten Genotypen differenziert werden kann und eine Kopplung zum Resistenzgen vorhanden ist (Abbildung 3). Dieses Ergebnis muss durch weitere Experimente noch verifiziert werden, um ausgehend von der Sequenzinformation der DNA-Sonde einen praxisrelevanten PCR-gestützten Marker zu entwickeln.

Im Ergebnis umfangreicher SSR-Analysen wurde mit einem Mikrosatellitenprimer (Bmac 0213) ein Polymorphismus detektiert, der einen Zusammenhang mit dem Merkmal Resistenz erkennen lässt (Abbildung 4). Sowohl MWG 896 (GRANER et al. 1991) als auch Bmac 0213 (LIU et al. 1996) wurden bereits kartiert und lassen eine Lokalisierung des Resistenzgens auf Chromosom 1H vermuten. Weiterführende Untersuchungen an Einzelpflanzen sowie eine Kopplungsanalyse stehen noch aus. Gleichzeitig wurde damit begonnen, auch in dieser Kreuzungspopulation mit der AFLP-Methode nach molekularen Resistenzmarkern zu suchen.

Nach einer Bulked Segregant Analyse wurden auch hier zahlreiche polymorphe Banden zwischen den Kreuzungspartnern beobachtet, eine Kopplung zum Resistenzlocus konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

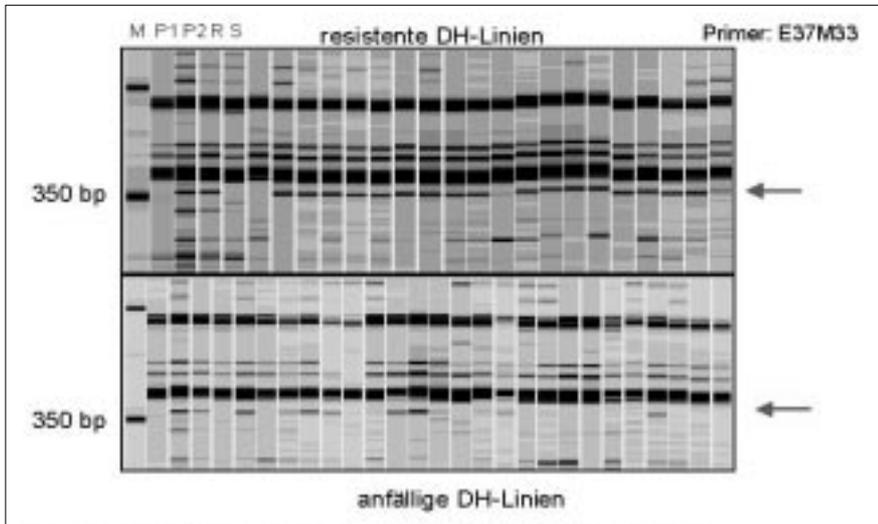


Abbildung 2: AFLP-Analyse einer DH-Linienpopulation der Kreuzung *H. spontaneum* 677 x 'Krona', P1 - 'Krona' (anfällig), P2 - *H. spontaneum* 677 (resistent), R - resistenter bulk, S - anfälliger bulk

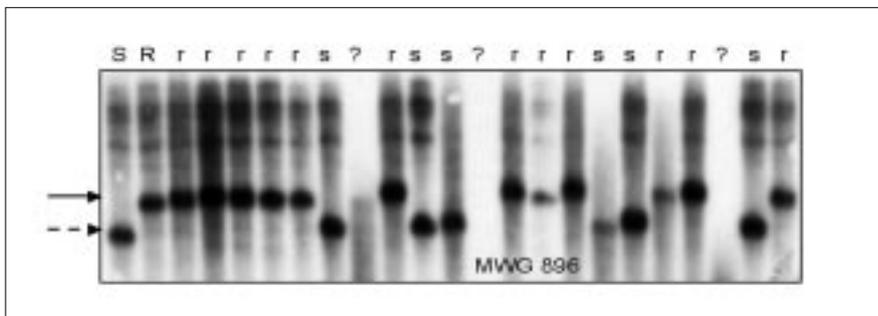


Abbildung 3: RFLP-Analyse einer DH-Linienpopulation der Kreuzung *H. spontaneum* 650 x 'Femina', DNA mit DraI geschnitten, hybridisiert mit ³²P markierter Sonde MWG 896, S - anfälliger Elter ('Femina'), R - resistenter Elter (*H. spontaneum* 650)

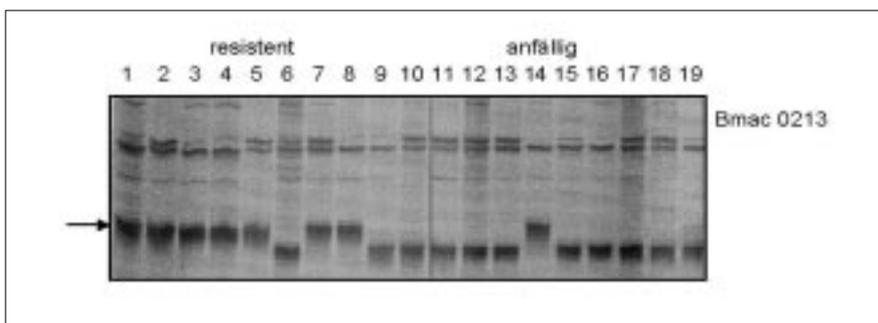


Abbildung 4: Amplifikationsprodukte verschiedener DH-Linien der Kreuzung *H. spontaneum* 650 x 'Femina' mit dem Mikrosatellitenprimer Bmac 0213

Ausblick

In Anbetracht der zunehmenden Bedeutung von molekularen Markern in der praktischen Pflanzenzüchtung werden im Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Pilze“ des Institutes für Epidemiologie und Resistenz die Arbeiten zur Markerentwicklung bei Gerste unter besonderer Berücksichtigung der Zwergrost- und Netzfleckenresistenz fortgesetzt. Unsere Untersuchungen konzentrieren sich auf spaltende Nachkommenschaften aus *H. vulgare* x *H. spontaneum*, da in dem *H. spontaneum* Material neue Resistenzträger gefun-

den wurden. Mit Hilfe der RAPD-, SSR- und AFLP-Methode wird nach weiteren enggekoppelten molekularen Resistenzmarkern gesucht, die eine Kartierung neuer Resistenzgene in den *H. spontaneum* Herkünften gestatten. Um die selektierten Marker in der Gerstenzüchtung effektiv zu nutzen, sollen sie in praxisrelevante PCR Marker konvertiert und dem Züchter für eine markergestützte Selektion zur Verfügung gestellt werden.

Literatur

- GRANER, A., A. JAHOR, J. SCHONDELMEIER, H. SIEDLER, K. PILLEN, G. FISCHBECK, G. WENZEL und R. HERRMANN, 1991: Construction of an RFLP map of barley. *Theor. Appl. Genet.* 83, 250-256
- GRANER, A., D. MICHALEK, D. SMILDE, S. STRENG, D. PEROVIC, A. DRESCHER, U. WALTHER und F. ORDON, 1999: Stand der Genkartierung bei der Gerste. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 46, 186-194
- IVANDIC, V., U. WALTHER und A. GRANER, 1998: Molecular mapping of a new gene conferring complete resistance to leaf rust (*Puccinia hordei* Otth.). *Theor. Appl. Genet.* 97, 1235-1239
- LIU, Z.W., R. M. BIYSHEV und M. A. SAGHAI MAROOF, 1996: Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 93, 869-876
- PROCHNOW, J., 1998: Selektion eines 500 Sippen umfassenden Sortimentes *Hordeum spontaneum* conv. Koch auf qualitative und quantitative Resistenz gegen den Zwergrost (*Puccinia hordei* Otth) unter Berücksichtigung weiterer pilzlicher Blattpathogene der Gerste. *Diss.*, Martin-Luther- Univ. Halle-Wittenberg, 123 S.
- SAGHAI MAROOF, M. A., K. M. SOLIMAN, R.A.JORGENSEN und R.W. ALLARD, 1984: Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 8014-8018
- VOS, R., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJNERS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER und M. ZABEAU, 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414
- WALTHER, U., D. KOPAHNKE, A. HABEKUSS, E. SCHLIEPHAKE und G. PROESELER, 1999: Aussichten der Nutzung von Wild- und Primitivformen der Gerste in der Resistenzzüchtung. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 46, 30-44