

## Entwicklung molekularer Marker für Schwarzrostresistenz in Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne* L.) und ihre Nutzung in Züchtungsprogrammen

### Development of molecular markers for stem-rust resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and their utilisation in breeding programmes

Katrin Beckmann<sup>1\*</sup>, Fred Eickmeyer<sup>2</sup>, Hans Lellbach<sup>1</sup>,  
Franz Xaver Schubiger<sup>3</sup>, Stephan Hartmann<sup>4</sup> und Peter Wehling<sup>1</sup>

#### Abstract

A detached-leaf test for resistance of perennial ryegrass to stem rust has been developed, which is easy to use and gives the opportunity of a stem-rust evaluation independent of environment and climatic conditions. Using this test, a monogenic, dominantly inherited resistance to stem rust in *Lolium perenne* was found and characterised. Correlation coefficients obtained for infestation scores in independent tests and with plants of varying age indicated satisfactory robustness of the test procedure and stage-independency of the resistance. Reaction to different inocula of the pathogen indicated a broad effectiveness of the resistance. Analysis with genomic resistance gene analogs and simple sequence repeat markers identified three markers which were linked to the resistance gene. Two flanking markers were mapped 2.6 and 6.7 cM to the resistance gene and may be used for selection. Utilisation of the markers in breeding programmes is discussed.

#### Keywords

Molecular markers, perennial ryegrass, *Puccinia graminis*, SSR, resistance, RGA

#### Einleitung

*Lolium*-Arten gehören zu den wirtschaftlich wichtigsten Gräsern in Europa. Die europäische Saatgutproduktion erfolgt in klimatisch besonders geeigneten Regionen. Auch in Deutschland wird Gräseraatgut produziert. Schwarzrost, verursacht durch *Puccinia graminis* ssp. *graminicola*, stellt zunehmend ein Problem in der Grassamenproduktion Deutschlands dar. Höhere Sommertemperaturen und mildere Winter als Folge des Klimawandels haben die Ausbreitung und Befallsstärke von Schwarzrost in Vermehrungsbeständen in den letzten Jahren stark ansteigen lassen. Infektionen, die zu hohen Ertragsausfällen und zu verminderter

Qualität des Erntegutes führen, sind auf Grund fehlender resistenter Sorten nur durch kostenintensive prophylaktische Fungizidmaßnahmen zu verhindern. Der damit sinkende Deckungsbeitrag der Grassamenproduktion veranlasst viele Landwirte, auf den Anbau anderer Kulturarten auszuweichen. Auf Grund der Witterungsabhängigkeit der Schwarzrostentwicklung und damit einhergehender saisonaler Unterschiede im Infektionsdruck ist es nicht in jedem Jahr möglich, auf Schwarzrostresistenz im Feld zu bonitieren. Daher sollte eine Möglichkeit zur witterungsunabhängigen, effizienten Selektion für die Entwicklung resistenter Sorten gefunden werden.

#### Material und Methoden

Zur Entwicklung eines *in situ* Blattsegmenttests und zur Erzeugung einer spaltenden Kartierungspopulation wurde die diploide *L. perenne*-Familie LPSR2061 (BECKMANN et al. 2008) genutzt. In Anlehnung an Arbeiten zum Braunrost im Roggen (WEHLING et al. 2003) wurde ein Resistenztest entwickelt, bei dem Blattsegmente auf Benzimidazolagaroseplatten (WOLFE 1963) ausgelegt und pneumatisch inokuliert wurden. Während der Inkubation wurde besonders die Temperaturführung an die Bedürfnisse von *Lolium* Schwarzrostpilzen angepasst (RODERICK und THOMAS 1997). Als Inokulum dienten Gemische von Uredosporen, die aus Sporensammlungen unterschiedlicher Orte und Jahre (Malchow 2003, Bornhof 2007, Steinach 2007) an isoliert angezogenen Pflanzen vermehrt worden waren. Zudem wurde von jeder der drei Sporenherkünften je ein Einzelpustelisolat erzeugt und zur Inokulation verwendet. Die Bonitur der Blattsegmente erfolgte 9 bis 10 Tage nach der Inokulation nach einer Skala von 1 bis 9 (BECKMANN et al. 2008), die Grenze zwischen resistenten und anfälligen Pflanzen wurde zwischen den Boniturnoten 4 und 5 gezogen.

Als Kartierungspopulation wurde die in Blattsegmenttests mit je 50% anfälligen und resistenten aufspaltende BC<sub>1</sub>-Familie LPSR1001 mit insgesamt 404 Pflanzen ausgewählt,

<sup>1</sup> Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, Rudolf-Schick-Platz 3a, OT Groß Lüsewitz, D-18190 SANITZ

<sup>2</sup> Saatzeit Steinach GmbH, Wittelsbacher Straße 15, D-94377 STEINACH

<sup>3</sup> Agroscope Reckenholz-Tänikon (ART), Reckenholzstraße 191, CH-8046 ZÜRICH

<sup>4</sup> Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Am Gereuth 4, D-85354 FREISING

\* Ansprechpartner: Katrin BECKMANN, katrin.beckmann1@gmx.de

die aus der Kreuzung einer resistenten und einer anfälligen Pflanze der Familie LPSR2061 entstanden war. Für Nachkommenschaftstests von bonitierten Phänotypen wurden Pflanzen der Familie LPSR1001 bei 30°C unter Ausnutzung von Pseudokompatibilität geselbstet und ihre Nachkommen dem Blattsegmenttest unterzogen.

Um die Eignung des Blattsegmenttests zur Vorhersage des Befalls im Feld zu überprüfen, wurde die Familie LPSR1001 vernalisiert, im Frühjahr 2008 verklont und die Klonteile an drei Standorten mit allgemein hohem Schwarzrostbefall (Steinach, Freising, Zürich) als vollständig randomisierte Gitteranlage mit je 340 Prüfgliedern in zwei Wiederholungen ins Feld gepflanzt. Bonituren erfolgten nach dem 1 bis 9 EUCARPIA-Boniturschema für Rost bei Weidelgräsern (SCHUBIGER et al. 2007) im August 2008 und 2009.

Für Kopplungsanalysen wurden SSR (simple sequence repeat) und RGA (resistance gene analogs) Marker aus unterschiedlichen Quellen genutzt (KUBIK et al. 1999, JONES et al. 2002, IKEDA 2005, HIRATA et al. 2006). Kopplungsanalysen wurden mit JoinMap v.4 (VAN OOIJEN 2006) durchgeführt und mit Hilfe der Rekombinationsfrequenz verrechnet. Zur Umwandlung der ermittelten Rekombinationsraten in Centi-Morgan (cM) wurde die Kosambi-Kartierungsfunktion verwendet. Rangkorrelationen nach Spearman wurden mit PLABSTAT Version 3A (UTZ 2003) berechnet: die Ergebnisse der Signifikanztests werden durch Symbole angegeben: \*\* signifikant bei  $\alpha=0,01$ .

## Ergebnisse

Die Ergebnisse der Blattsegmenttests von 394 Individuen der Familie LPSR1001 zeigten mit 195:199 eine eindeutige 1:1 Aufspaltung zwischen resistenten und anfälligen Pflanzen, Individuen mit einer mittleren Krankheitsausprägung (Boniturnoten von 4-6) traten kaum auf (5/394). Für zehn Pflanzen der Familie LPSR1001 konnte kein Modalwert ermittelt werden, da sie schon nach der ersten Beprobung eingegangen waren. Blattsegmenttests zu unterschiedlichen Pflanzenentwicklungsstadien und mit drei verschiedenen Sporenherkünften wiesen mit 0,801\*\* bis 0,931\*\* hohe Korrelationen in der Boniturvergabe auf, daher wurde aus den Ergebnissen der Modalwert für jede Pflanze ermittelt. Ergebnisse von Inokulationen mit drei Einzelpustelisolaten zeigten mit 0,827\*\* bis 0,878\*\* hohe Korrelationen untereinander und zu den Modalwerten über die Sporenmischungen. Die Grenze zwischen anfälligen und resistenten Individuen, die zwischen Boniturnote 4 und 5 gezogen wurde, konnte durch Blattsegmenttests von Selbstungsnachkommen der Familie LPSR1001 verifiziert werden.

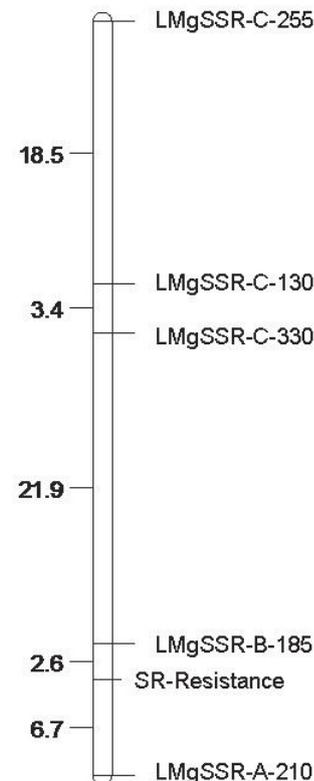
Auf Grund des strengen Winters 2008/2009 trat an den Standorten Zürich und Steinach im Sommer 2009 kaum Schwarzrost im Feldversuch auf, in Freising war der Versuch wegen erheblicher Niederschläge im Frühjahr und Sommer vollständig mit Blattkrankheiten befallen und ins Lager gegangen. Daher konnten die Feldversuche nur im Sommer 2008 bonitiert werden (Tabelle 1).

Die Kopplungsanalyse ergab mehrere mit der Resistenz gekoppelte SSR-Marker, unter anderem auch zwei flan-

**Tabelle 1: Ergebnisse der Feldversuche 2008 an drei Orten mit je zwei Wiederholungen und N=340 Phänotypen**

**Table 1: Results of field trials in 2008 at three locations with two replications and N=340 phenotypes (range of scores, mean, correlation coefficients between field trials and detached leaf test for each replication and their mean)**

Statistik / Ort	Freising	Zürich	Steinach
Variationsbreite Bonituren	1 - 9	1 - 8	1 - 9
Mittelwert	3,6	1,7	2,3
Korrelation Feld/Test			
1. Wiederholung	0,703**	0,422**	0,452**
2. Wiederholung	0,717**	0,385**	0,417**
Mittel 1./2. Wh.	0,750**	0,463**	0,513**



**Abbildung 1: Kartierung der Schwarzrostresistenz mit molekularen Markern (Marker wurden anonymisiert)**

**Figure 1: Mapping of the stem-rust resistance with molecular markers (markers are anonymous)**

kierende Marker im Abstand von 2,6 und 6,7 cM zum Resistenzgen (Abbildung 1).

## Diskussion

Hohe Korrelationen zwischen den Ergebnissen unabhängiger Blattsegmenttests auch zu unterschiedlichen Pflanzenentwicklungsstadien weisen auf eine gute Wiederholbarkeit des Tests und auf das Vorhandensein einer stadienunspezifischen Resistenz hin, wie sie z. B. auch beim Braunrost im Roggen beobachtet wurde (ROUX et al. 2004). Die beobachtete 1:1-Aufspaltung der Familie LPSR1001 in resistente und anfällige Individuen, die durch Nachkommenschaftstests abgesichert werden konnte, spricht für eine monogene und dominante Vererbung der Resistenz.

Die Wirksamkeit der gefundenen Resistenz gegen die drei verwendeten Inokula lässt auf eine rassenunspezifische Resistenz hoffen, wie sie z.B. gegen Schwarzrost auch im Weizen und in der Gerste gefunden wurde (MCINTOSH et al. 1995, AYLIFFE und LAGUDAH 2004), und könnte auf eine gute Beständigkeit der Resistenz hindeuten.

Die Ergebnisse der Feldversuche zeigen deutlich die Witterungsabhängigkeit des Schwarzrostbefalls im Feld. So kann es vorkommen, dass infolge fehlenden Infektionsdrucks während des gesamten Züchtungsprozesses einer Sorte nicht auf Schwarzrostresistenz selektiert werden kann. Erschwerend für eine Züchtung auf Schwarzrostresistenz kommt hinzu, dass im Feldversuch in der Regel verschiedene Blattkrankheiten gleichzeitig auftreten und speziell die Rostkrankheiten schwer zu unterscheiden sind. An den Standorten Steinach und Zürich trat auch im Jahr 2008 kaum Schwarzrost im Feldversuch auf; die signifikanten Korrelationen zwischen den beiden Wiederholungen vom Feld und den Beobachtungen aus dem Blattsegmenttest sind hier nur auf die hohe Anzahl an Prüfgliedern zurückzuführen. Höherer Infektionsdruck herrschte am Versuchsstandort Freising; hier zeigen die Ergebnisse mit Korrelationen von 0,703\*\* für die erste Wiederholung und 0,717\*\* für die zweite Wiederholung, sowie 0,750\*\* für die Mittelwerte über die zwei Wiederholungen gute Übereinstimmungen der Feldbonituren der einzelnen Pflanzen zu ihren Modalwerten im Blattsegmenttest. Somit gelang es erstmals, einen Blattsegmenttest für Schwarzrost bei Weidelgräsern zu entwickeln, der eine Bonitur unabhängig von Jahreszeit und Witterungsbedingungen ermöglicht. Im Vergleich zu den in den USA angewandten künstlichen Infektionsmethoden für Schwarzrost in Gräsern, die allesamt auf der Inokulation von Pflanzen im Gewächshaus oder in Klimakammern beruhen (ROSE-FRICKER et al. 1986, WELTY und BARKER 1992), ist der entwickelte Blattsegmenttest extrem Platz sparend und energieeffizient, da lediglich ein Klimaschrank und keine Gewächshausfläche oder Klimakammer benötigt wird. Weitere Vorteile des Blattsegmenttests liegen in der Möglichkeit seines Einsatzes zu einem frühen Pflanzenentwicklungsstadium und der Schonung der Spenderpflanzen, die eine zeitgleiche und unabhängige Untersuchung der gleichen Pflanze auf unterschiedliche Erreger oder Isolate ermöglicht.

Molekulare Analysen konnten zwei flankierende Marker (LMgSSR-A-210 und LMgSSR-B-185) für das gefundene Resistenzgen detektieren, die gemeinsam zur Selektion verwendet werden können. Aus den für die beiden Marker ermittelten Rekombinationsfrequenzen zum Resistenzgen von  $r_1=0,0253$  bzw.  $r_2=0,0633$  ergibt sich nach WEBER und WRICKE (1994) eine gemeinsame Rekombinationsfrequenz von  $r_{\text{ges}}=0,0017$  zum Resistenzgen. Diese Marker bieten zusammen somit eine gute Möglichkeit zur indirekten Selektion resistenter Individuen. Der entwickelte Blattsegmenttest ist zwar einfach in der Anwendung und unerlässlich zum ersten Auffinden einzelner Resistenzgene; der limitierende Faktor besteht aber in der Verfügbarkeit des Inokulums. Bei geringem Schwarzrostbefall im Feld ist natürliches Inokulum kaum vorhanden, die Uredosporen müssen dann in einem zeitaufwändigen Verfahren unter kontrollierten Bedingungen an anfälligen Pflanzen

vermehrt werden. Die Möglichkeit einer markergestützten Selektion zur Einkreuzung der gefundenen Resistenzen in Zuchtmaterial erscheint somit züchtungsmethodisch interessant.

## Danksagung

Dank gilt Ruth Masermann, Marion Hos und Daniela Kempke für die Unterstützung bei den technischen Arbeiten. Das Projekt wurde finanziell gefördert durch die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen Otto von Guericke e.V. (AiF) und in Kooperation mit der Saatzucht Steinach GmbH durchgeführt.

## Literatur

- AYLIFFE MA, LAGUDAH ES, 2004: Molecular genetics of disease resistance in cereals. *Ann Bot* 94, 765-773.
- BECKMANN K, LELLBACH H, WEHLING P, 2008: Genetische Analyse und molekulare Charakterisierung von Schwarzrostresistenz in Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne* L.). Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut, 1. Nachwuchswissenschaftler-Forum in Quedlinburg, 12-16.
- HIRATA M, CAI H, INOUE M, YUYAMA N, MIURA Y, KOMATSU T, TAKAMIZO T, FUJIMORI M, 2006: Development of simple sequence repeat (SSR) markers and construction of an SSR-based linkage map in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Theor Appl Genet* 113, 270-279.
- IKEDA S, 2005: Isolation of disease resistance gene analogs from Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Grassland Sci* 51, 63-70.
- JONES ES, DUPAL MP, DUMSDAY JL, HUGHES LJ, FORSTER JW, 2002: An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor Appl Genet* 105, 577-584.
- KUBIK C, MEYER WA, GAUT BS, 1999: Assessing the abundance and polymorphism of simple sequence repeats in perennial ryegrass. *Crop Sci* 39, 1136-1141.
- MCINTOSH RA, WELLINGS CR, PARK RF, 1995: Wheat rusts: an atlas of resistance genes. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- RODERICK HW, THOMAS BJ, 1997: Infection of ryegrass by three rust fungi (*Puccinia coronata*, *P. graminis* and *P. loliina*) and some effects of temperature on the establishment of the disease and sporulation. *Plant Pathol* 46, 751-761
- ROSE-FRICKER CA, MEYER WA, KRONSTAD WE, 1986: Inheritance of resistance to stem rust (*Puccinia graminis* subsp. *graminicola*) in six perennial ryegrass (*Lolium perenne*) crosses. *Plant Dis* 70, 678-681.
- ROUX SR, HACKAUF B, LINZ A, RUGE B, KLOCKE B, WEHLING P, 2004: Leaf-rust resistance in rye (*Secale cereale* L.). 2. Genetic analysis and mapping of resistance genes *Pr3*, *Pr4*, and *Pr5*. *Theor Appl Genet* 110, 192-201.
- SCHUBIGER FX, STRECKEISEN P, BOLLER B, 2007: The EUCARPIA multisite rust evaluation - Results of the trials 2004. In: Rosellini D, Veronesi F (eds), Breeding and seed production for conventional and organic agriculture, Proc 26<sup>th</sup> Meeting EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section, 3-7 Sep 2006, Perugia, Italy, 154-158. Università degli Studi di Perugia.
- UTZ HF, 2003: PLABSTAT, ein Computerprogramm zur statistischen Analyse von pflanzenzüchterischen Experimenten. Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik, Universität Hohenheim, Stuttgart.
- VAN OOIJEN JW, 2006: JoinMap version 4.0, software for calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen.

- WEBER WE, WRICKE G, 1994: Genetic markers in plant breeding. Fortschritte der Pflanzenzüchtung, Beiheft Z Pflanzenzüchtg 16, 57-58.
- WEHLING P, LINZ A, HACKAUF B, ROUX SR, RUGE B, KLOCKE B, 2003: Leaf-rust resistance in rye (*Secale cereale* L.). 1. Genetic analysis and mapping of resistance genes *Pr1* and *Pr2*. Theor Appl Genet 107, 432-438.
- WELTY RE, BARKER RE, 1992: Evaluation of resistance to stem rust in perennial ryegrass grown in controlled and field conditions. Plant Dis 76, 637-641.
- WOLFE MS, 1963: Use of benzimidazole in the study of wheat powdery mildew. Trans Br Mycol Soc 46, 620.