

Umfassende *Rhynchosporium secalis* Resistenz bei Gerste - von der Kartierung über die Entwicklung diagnostischer Selektionsmarker zum Pre-Breeding Material

Kerstin Hofmann^{1*}, Peter Greif², Claus Einfeldt³, Josef Holzapfel⁴,
 Markus Herz¹ und Günther Schweizer¹

Abstract

Rhynchosporium secalis (Oudem) J.J. Davis, the causal agent of leaf scald is one of the major leaf diseases of barley (*Hordeum vulgare* L.). So far, only three major resistance loci have been identified in cultivated barley. These are the complex locus *Rrs1* (*Rh-Rh3-Rh4*) on chromosome 3H close to the centromere, the locus *Rrs2* (*Rh2*) on the short arm of chromosome 7H, and the locus *Rrs15*_{C18288} on the short arm of chromosome 2H. The objective of the present study is to identify new resistance loci or alleles of known loci, to develop diagnostic markers for these loci and to use these markers for marker assisted selection to enhance the resistance level against scald in the German barley germplasm pool.

For this purpose five DH-populations segregating for scald resistance were phenotyped in the greenhouse using a single spore isolate of *Rhynchosporium secalis* and then genotyped using SSRs and specific STS markers associated with the different scald resistance loci. By this the resistance sources of four of the populations could be identified so far. Two contain the *Rrs2*-locus or alleles of it, the other two carry the *Rrs1*-locus. One of the latter populations also contained another resistance locus until now unknown in cultivated barley. Via a AFLP-poolscreening a co-segregating fragment was identified and mapped to the short arm of chromosome 6H. It is supposedly an allele of the *Rrs13* locus identified in wild barley.

Keywords

Barley, *Hordeum vulgare*, scald, *Rhynchosporium secalis*, marker assisted selection

Einleitung

Die durch den Pilz *Rhynchosporium secalis* verursachte Blattfleckenkrankheit führt bei Gerste zu erheblichen Ertrags- und Qualitätseinbußen. Der Züchtungsfortschritt hinsichtlich der Resistenz gegenüber diesem Pathogen liegt jedoch weit hinter den Möglichkeiten zurück, was auf den sehr kleinen Pool an Resistenzdonoren sowie den Mangel

an diagnostischen Selektionsmarkern zurückzuführen ist. So sind in kultivierter Gerste (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) bisher lediglich drei verschiedene Resistenzloci bekannt. Dies sind der *Rrs1*-(*Rh-Rh3-Rh4*-)Locus in der Nähe des Centromers von Chromosom 3H (GRANER und TEKAUZ 1996), der *Rrs2*-(*Rh2*-)Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 7H (SCHWEIZER et al. 1995) und der *Rrs15*_{C18288}-Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 2H (SCHWEIZER et al. 2004). Bislang sind für keinen dieser Resistenzloci diagnostische Selektionsmarker verfügbar, eine Kombination mehrerer Resistenzloci für eine ausdauernde Resistenz ist daher äußerst schwierig. Ziel dieses Projektes ist es daher, neue Resistenzloci oder neue Allele bekannter Loci zu identifizieren und für diese Loci diagnostische Selektionsmarker zu entwickeln um mittels markergestützter Selektion eine Integration dieser Resistenzloci in den deutschen Gerstengroup zu ermöglichen.

Material und Methoden

Für das Projekt wurden fünf verschiedene Resistenzdonoren internationaler Herkunft ausgewählt.

Diese wurden mit gegen *Rhynchosporium secalis* anfälligen Braugerstensorten gekreuzt und aus den F1-Pflanzen DH-Populationen für die Kartierung erstellt. Eine Übersicht über das Pflanzenmaterial bietet *Tabelle 1*.

Die Phänotypisierung geschieht im Gewächshaus in einem gut etablierten und reproduzierbaren Biotest. Die Pflanzen werden im 3-Blattstadium mit einem Einzelsporisolat inokuliert und zwei Wochen später mit einer Skala von 0 = gesund bis 4 = voll anfällig bonitiert. Zur Validierung der Gewächshausdaten führen die kooperierenden Züchter

Tabelle 1: Übersicht über die im Projekt verwendeten DH-Populationen

| DH | Resistenzdonor | Herkunft | a-Elter | Umfang |
|---------|----------------|-----------|---------|--------|
| 761 | Clho 3515 | Spanien | Steffi | 78 |
| 757 | Clho 1225 | Äthiopien | Steffi | 85 |
| 32783 | CNE 145 | Spanien | Beatrix | 523 |
| 824 | Escaldadura | Uruguay | Hendrix | 167 |
| 186-188 | Pewter | England | Hendrix | 348 |

¹ Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 2, D-85354 FREISING

² Saatucht Streng, Aspachhof, D-97215 UFFENHEIM

³ Saatucht Ackermann, Ringstr. 17, D-94342 IRLBACH

⁴ Saatucht Breun, Amselweg 1, D-91074 HERZOGENAURACH

* Ansprechpartner: Kerstin HOFMANN, kerstin.hofmann@lfl.bayern.de

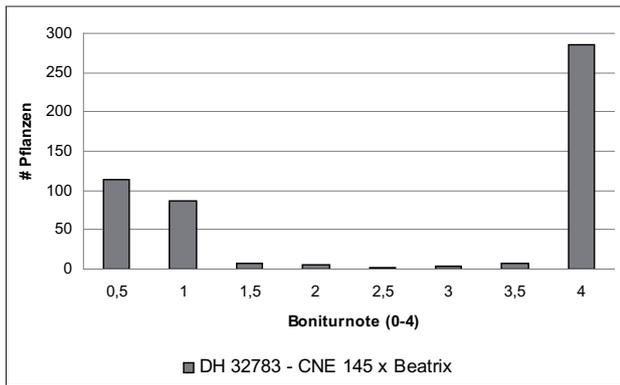


Abbildung 1: Verteilung der Linien der DH-Population 32783 auf die GWH-Boniturnoten

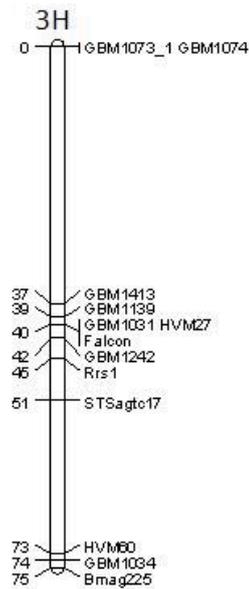


Abbildung 2: Genetische Karte des Centromerbereichs von Chromosom 3 H in der DH 32783

Feldversuche durch. Die Verteilung der Boniturdaten (Abbildung 1-3) lässt Rückschlüsse auf die Anzahl der jeweils beteiligten Resistenzloci zu. Die Genotypisierung wird mit Mikrosatelliten und spezifischen, mit den verschiedenen *R.*

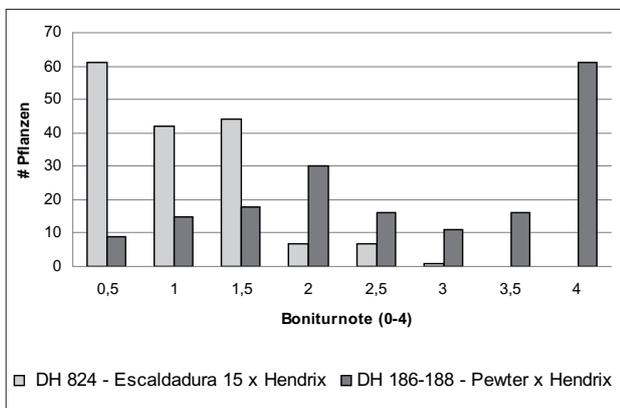


Abbildung 3: Verteilung der Linien der DH-Populationen 824 und 186-188 auf die Boniturnoten

secalis-Resistenzloci assoziierten STS-Markern durchgeführt. Für das AFLP-Poolscreening wird das Enzymsystem Sse/Mse verwendet. Zur Erstellung der Chromosomenkarten wird das Programm JoinMap3.0 (VAN OOIJEN und VOORRIPS 2001) benutzt.

Ergebnisse und Diskussion

Die DH 32783 mit dem Resistenzdonor CNE 145 (Abbildung 1) zeigt eine phänotypische Spaltung, die auf ein beteiligtes Resistenzgen schließen lässt. Dieses Gen konnte auf Chromosom 3H in die Nähe des Centromers kartiert werden (Abbildung 2), es dürfte sich hierbei um ein Allel des *Rrs1*-Locus handeln. Die Population weist eine hohe Rekombinationsrate zwischen diesem Gen und den nächstliegenden Markern auf. Diese soll genutzt werden, um mittels AFLP-Poolscreening neue, enger gekoppelte Marker für dieses Gen zu entwickeln und so den Bereich um das Gen soweit einzuengen, dass das Screenen von BAC-Bibliotheken erfolgversprechend wird.

Die Verteilung der DH 824 (Abbildung 3) lässt zunächst zwei beteiligte Gene vermuten. Die Boniturergebnisse für den anfälligen Elter Hendrix zeigten jedoch, dass diese Sorte eine gewisse Basalresistenz besitzt. In Kombination mit dem hoch effizienten Gen des Resistenzdonors Escaladura 15 erklärt das die stark linksschiefe Verteilung der Boniturdaten.

Ähnliches gilt für die DH 186-188 (Abbildung 3). Das Resistenzgen des Donors Pewter ist bei weitem nicht so effizient wie das von Escaladura 15, und kommt die Basalresistenz von Hendrix hinzu, erklärt das die rechtsschiefe Verteilung der Boniturdaten.

Bei beiden Populationen konnte das Resistenzgen auf Chromosom 7H in die Nähe des mit *Rrs2* kosegregierenden STS-Markers Atlas14 kartiert werden. Es dürfte sich also um zwei verschiedene Allele dieses Locus handeln. Die unterschiedliche Leistung dieser zwei Allele eines Locus macht deutlich, dass für eine effiziente Resistenzzüchtung nicht nur für den Locus diagnostische Marker benötigt werden, sondern solche, die auch zwischen den verschiedenen Allelen differenzieren können.

Die Resistenz des Donors Clho1225 ist bislang ungeklärt. Die Verteilung der Boniturdaten der DH 757 (Abbildung 4)

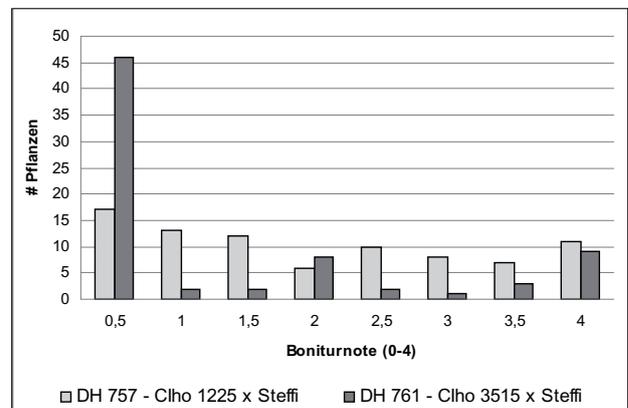


Abbildung 4: Verteilung der Linien der DH-Populationen 757 und 761 auf die Boniturnoten

Tabelle 2: Verteilung der beiden Resistenzloci Rrs1 und Rrs13 auf die einzelnen Linien der DH 761

| | nur Rrs1 (agtc 17) | nur Rrs13 (2048_2) | beide | keines | gesamt |
|----|--------------------|--------------------|-------|--------|--------|
| r | 23 | 8 | 16 | 1 | 48 |
| mr | 0 | 8 | 0 | 7 | 15 |
| ma | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 |
| a | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |

lässt zunächst ein beteiligtes Resistenzgen vermuten, auffällig ist jedoch die hohe Anzahl an Linien die nur schwach resistent oder schwach anfällig sind. Es muss daher auch in Betracht gezogen werden, dass es sich hierbei um eine hochwirksame quantitative Resistenz handelt. Weitere Phänotypisierungen sowie eine QTL-Analyse sollen hierüber Aufschluss geben.

Als einziger Donor ist CIho 3515 Träger von zwei Major-Resistenzgenen. Dies wird durch die stark linksschiefe Verteilung der Boniturdaten deutlich (Abbildung 4). Eines dieser Gene konnte mit Hilfe des eng gekoppelten STS-Markers agtc17 als ein Allel des *Rrs1*-Locus identifiziert werden. Etwa zwei Drittel der resistenten Linien sind Träger dieses Gens (Tabelle 2). Um den zweiten Resistenzlocus zu klären, wurde ein AFLP-Poolscreening mit 10 der verbleibenden resistenten Linien sowie 10 anfälligen Linien durchgeführt werden. Hierbei konnte ein kosegregierendes DNA-Fragment identifiziert, sequenziert und in einen kodominanten Marker (2048_2) umgewandelt werden, der auf den kurzen Arm von Chromosom 6H kartiert (Abbildung 5). An dieser Position wurde von ABBOTT et al. (1995) der Resistenzlocus *Rrs13* in Wildgerste gefunden. Es ist daher anzunehmen, dass es sich um ein Allel dieses Resistenzlocus handelt, der damit erstmals auch in kultivierter Gerste gefunden werden konnte. Weitere Analysen hierzu und eine Absicherung der Karte sind in Arbeit.

Zusammenfassung

Fünf Kartierungspopulationen wurden zunächst hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber *Rhynchosporium secalis* phänotypisiert. Anschließend wurden die Populationen mit bekannten mit *R. secalis*-Resistenzgenen gekoppelten Markern überprüft. Während sich die DH 757 (CIho 1225) in Arbeit befindet, konnten die Donoren der DHs 186-188 (Pewter) und 824 (Escaladura 15) als Träger des *Rrs2*-Resistenzlocus identifiziert werden. CNE 145, der Donor der DH 32783-Resistenz stellte sich als Träger des *Rrs1*-Locus heraus, ebenso wie der Donor der DH 761 (CIho 3515). Letzterer ist außerdem Träger des *Rrs13*-Resistenzlocus, der bis dato nur in Wildgerste bekannt war.

Diese Ergebnisse sind ein Zwischenstand der Forschungsarbeiten, die im Oktober 2007 begonnen wurden.

Die Förderung des Vorhabens erfolgt aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutzes (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Programmes zur Innovationsförderung. Laufzeit: Oktober 2007-September 2010

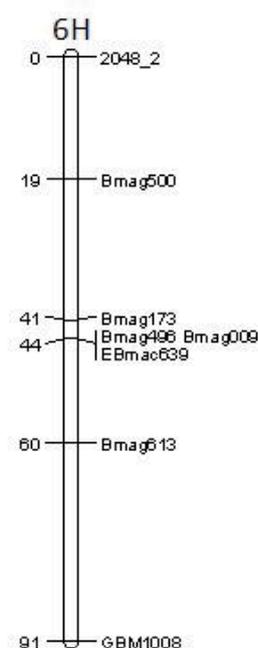


Abbildung 5: Genetische Karte des kurzen Arms von Chromosom 6 H in der DH 761

Literatur

- ABBOTT, D.C., E.S. LAGUDAH and A.H.D. BROWN, 1995: Identification of RFLPs Flanking a Scald Resistance Gene on Barley Chromosome 6. *J Heredity* 86(2):152-154.
- GRANER, A. and A. TEKAUZ, 1996: RFLP mapping of a dominant gene conferring resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*). *Theor Appl Genet* 93:421-425.
- PATIL, V., Å. BJØRNSTAD and J. MACKEY, 2003: Molecular mapping of a gene *Rrs4CI11549* for resistance to barley scald (*Rhynchosporium secalis*). *Molecular Breeding*.12:169-183.
- SCHWEIZER, G.F., M. HERZ, S. MIKOLAJEWSKI, M. BRENNER, L. HARTL and M. BAUMER, 2004: Genetic mapping of a novel scald resistance gene *Rrs15_{CI8288}* in barley. 9th International Barley Genetics Symposium, Brno, Czech Republic. contrib papers: 258-265.
- SCHWEIZER, G., M. RÖDER, L. HARTL und M. BAUMER, 2002: Entwicklung und Anwendung molekularer Selektionsmarker für *Rhynchosporium secalis*-Resistenz bei Gerste. *Vortr Pflanzenzüchtg* 54:259-262.
- SCHWEIZER, G.F., M. BAUMER, G. DANIEL, H. RUGEL and M.S. RÖDER, 1995: RFLP markers linked to scald (*Rhynchosporium secalis*) resistance gene Rh2 in barley. *Theor Appl Genet* 90:920-924.
- VAN OOIJEN, J.W. and R.E. VOORRIPS 2001: JoinMap@3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- WAGNER, C., G. SCHWEIZER, M. KRÄMER, A.G. DEHMER-BADANI, F. ORDON and W. FRIEDT, 2008: The complex quantitative barley-*Rhynchosporium secalis* interaction: newly identified QTL may represent already known resistance genes. *Theor Appl Genet* 118:113-122.