

Entwicklung molekularer Marker für Resistenzgene gegen *Oculimacula* spp., die Erreger der Halmbruchkrankheit im Weizen (*Triticum aestivum*)

Nina Meyer^{1*}, Volker Lind¹, Marc Zahn^{1,2}, Wolfgang Friedt³ und Frank Ordon¹

Zusammenfassung

Die Halmbruchkrankheit im Weizen kann zu erheblichen Ertragseinbußen führen. Durch die Steigerung des Getreideanteiles in der Fruchtfolge, sowie dem grundsätzlichen Anstieg der Weizenanbaufläche in den letzten 10 Jahren, gewinnt der parasitäre Halmbruch zunehmend an Bedeutung. Verursacht wird die Krankheit durch *Oculimacula yallundae* (syn. *Tapesia yallundae*, anamorph: *Helgardia yallundae*) (OY) und *O. aciformis* (syn. *T. aciformis*, anamorph: *Helgardia aciformis*) (OA). Eine effiziente Strategie zur Reduzierung von Ertragsverlusten ist der Anbau resistenter Sorten. Da die phänotypische Erfassung der Symptome auf dem Feld arbeits- und zeitintensiv ist, stellen molekulare Marker in der Resistenzzüchtung gegen diese Pathogene wertvolle Hilfsmittel dar. Grundlage für die Entwicklung molekularer Marker sind verlässliche phänotypische Daten. Zur Gewinnung dieser Daten wurde eine quantitative Real-time PCR Methode entwickelt, welche basierend auf einer künstlichen Inokulation im Gewächshaus das Pathogen bis zu einer Nachweisgrenze von 0.1 pg detektiert. In einer nachfolgenden Analyse von Feldproben konnte eine hohe signifikante Korrelation zwischen Feldbonitur und den mittels Real-time-PCR gewonnenen Daten für OY nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich in Gewächshausversuchen, dass Genotypen mit verschiedenen Resistenzgenen (*Pch1*, *Pch2*) und anfällige Genotypen eindeutig anhand des Gehaltes an Pathogen-DNA differenziert werden können.

In Analysen zur Entwicklung molekularer Marker für die Resistenzgene *Pch1*, *Pch2* und einer aus *Ae. kotschyi* stammenden Resistenz konnten unter Verwendung der Bulk Segregant Analysis (BSA) mittels SSR und AFLPs zwei AFLP und drei SSR Marker für *Pch1* sowie und 5 polymorphe AFLP-Fragmente als potentielle Kandidaten für *Pch2* identifiziert werden. Bisher lieferten jedoch weder molekulare noch cytogenetische Analysen Hinweise auf die Lokalisierung der Resistenz aus *Ae. kotschyi*.

Abstract

Eyespot disease in wheat can lead to substantial yield losses. Due to a rising portion of cereals in crop rotations and an in general increasing acreage of wheat during the last 10 years eyespot has gained evident importance. The two pathogens *Oculimacula yallundae* (syn. *Tapesia yallundae*, anamorph: *Helgardia yallundae*) (OY) and *O. aciformis* (syn. *T. aciformis*, anamorph: *Helgardia aciformis*) (OA) are the agents of eyespot. An efficient strategy to reduce yield losses caused by this disease is growing of resistant cultivars. Breeding for resistance to eyespot disease may become more effective by using closely linked markers as symptom scoring in the field is laborious and time consuming. A prerequisite for efficient marker development is the availability of reliable phenotypic data. Therefore, a method for phenotyping DH-populations in the greenhouse by quantitative Real-time-PCR was developed in a first step facilitating a detection of the pathogen up to 0.1 pg.

A highly significant correlation between scoring in the field and the Real-time-PCR Assay for OY was observed. Furthermore, the greenhouse test for OY facilitates a clear cut differentiation between lines carrying different resistance genes.

Development of molecular markers is carried out for resistance genes *Pch1*, *Pch2* and a resistance derived from *Ae. kotschyi*. Based on bulked segregant analysis and SSR and AFLP analyses two AFLP and three SSR markers were identified for *Pch1* and five AFLP fragments with potential linkage to *Pch2*. Until now, neither molecular nor cytogenetic data give hint to the localization of the resistance of *Ae. kotschyi*.

Keywords: eyespot, Real-time PCR, resistance, *Pch1*, *Pch2*

Einleitung

Die Halmbruchkrankheit im Weizen kann zu erheblichen Ertragseinbußen führen. Durch zunehmenden Getreideanteil in der Fruchtfolge und eine kontinuierliche Steigerung

der Weizenanbaufläche in den letzten zehn Jahren, erhöht sich das Potenzial von Infektionen durch die pilzlichen Erreger der Halmbruchkrankheit *Oculimacula yallundae* (syn. *Tapesia yallundae*, anamorph: *Helgardia yallundae*)

¹ Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Julius-Kühn Institut (JKI), Erwin-Baur-Strasse 27, D-06484 Quedlinburg

² Institut für Pflanzenernährung, Naturwissenschaftliche Fakultät, Leibniz Universität Hannover, Herrenhäuser Straße 2, D-30419 Hannover

³ Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung (IFZ), Justus-Liebig-Universität Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen

* Ansprechpartner: MSc. Agrar Nina Meyer, nimeyer@gmx.de

(OY) und *O. acuformis* (syn. *T. acuformis*, anamorph: *Helgardia acuformis*) (OA). Weiterhin ist schon lange bekannt, dass die Verbreitung der Erreger durch reduzierte Bodenbearbeitung und frühe Herbstaussaaten begünstigt wird (MIELKE 1995). Eine wirksame Strategie zur Vermeidung erheblicher Ertragsverluste ist die Nutzung von Resistenzen. Mittlerweile sind verschiedene Resistenzen gegenüber den Erregern OA und OY bekannt. Innerhalb der Gattung *Triticum* konnte lediglich das Resistenzgen *Pch2*, aus der französischen Sorte ‚Cappelle Desprez‘ identifiziert werden (DE LA PEÑA et al. 1996) Weiterhin wurde ein Gen in *Ae. ventricosa* (*Pch1*) identifiziert und von MAIA (1967) in den Kulturweizen übertragen. Der dabei selektierte Stamm ‚VPM1‘ wurde weltweit als Kreuzungselter verwendet. Eine weitere Resistenz gegen *P. herpotrichoides*, die bereits in den Kulturweizen eingekreuzt wurde, stammt aus der tetraploiden *Ae. kotschyi*-Herkunft AE120 (Aserbaidschan). Sie wurde zuerst von FREIER (1982) nachgewiesen und später von BANG (1986) bestätigt. Von anderen Resistenzen, die teilweise in Weizen übertragen sind, aus den Gattungen *Dasyphyrum* (*Pch3*) (YILDIRIM et al. 1998) und *Thinopyrum* (LI et al. 2004) wird berichtet. Der phänotypische Nachweis von Resistenzgenen wie z.B. *Pch2* und *Pch3* ist mittels visueller Bonitur nur schwer möglich, da diese weniger effektiv als *Pch1* sind. Im Hinblick auf eine Verbesserung des Resistenz ist in der markergestützten Kombination dieser Resistenzen eine effektive Möglichkeit zu sehen (Pyramidisierung), so dass es Ziel dieser Arbeit war, basierend auf einer verlässlichen Phänotypisierungsmethode, molekulare Marker für die genannten Resistenzen zu entwickeln.

Material und Methoden

Als Grundlage für die Entwicklung enggekoppelter Marker für das Resistenzgen *Pch2* wurde im Rahmen der Phänotypisierung von DH-Populationen im Gewächshaus eine quantitative Real-time-PCR Methode entwickelt (MEYER et al. 2006). Die Methode wurde in Feld- und Gewächshausversuchen überprüft. Zur Verifizierung der Real-time-PCR Methode für OA und OY wurden 2006 47 Linien an zwei Orten in 3 Wiederholungen angebaut, bonitiert und mittels Real-time PCR analysiert. Im folgenden Jahr erfolgte die Beprobung von 38 Linien an denselben Standorten in je 3 Wiederholungen. Die künstliche Inokulation erfolgte mit einem Isolatgemisch. Im Gewächshaus wurden danach 5 Linien verschiedener Resistenzniveaus mit jeweils 15 Pflanzen/Linie für einen Inokulationsversuch genutzt. Es handelt sich um die Linien ‚Hermann‘ (*Pch1*), ‚Certo‘ (*Pch1*), ‚CappelleDeprez‘ (*Pch2*), ‚Borenos‘ (-) und ‚St.906‘ (-). Die Inokulation erfolgte jeweils mit 3 verschiedenen Inokulationsvarianten OA, OY und OA+OY. Die Beprobung der Pflanzen wurde 8, 10 und 12 Wochen nach Inokulation durchgeführt. Für die Entwicklung von Markern für die Resistenzgene *Pch1*, *Pch2* und der Resistenz aus *Ae. kotschyi* standen DH-Populationen, die auf Kreuzungen zwischen dem jeweiligen Resistenzträger und einer hoch anfälligen Linie (St.906) beruhen, zur Verfügung. Für *Pch1* erfolgte die Phänotypisierung mittels Endopeptidase Test (MCMILLIN et al. 1986), da von diesem bekannt ist, dass eine vollständige Kopplung zum Gen *Pch1* vorliegt.

Tabelle 1: *O. yallundae* DNA Gehalte [pg] in Weizensorten 12 Wochen nach künstlicher Inokulation im Gewächshaus, gemittelt über 3 Wiederholungen. (Gleiche Buchstaben bedeuten keine signifikanten Unterschiede für LSD ($P=0.05$)).

Bezeichnung	DNA Gehalt OY [pg]
Certo (<i>Pch1</i>)	6.25 a
Hermann (<i>Pch1</i>)	17.09 b
CapelleDeprez (<i>Pch2</i>)	31.69 c
Borenos (-)	79.77 d
St906 (-)	271.91 e
Mittel (OY)	81.34

Für *Pch2* spaltende DH-Populationen wurden durch die neu entwickelte Real-time-PCR Methode der Gehalt an pilzlicher DNA in inokulierten Pflanzen im Gewächshaus bestimmt, während die DH-Population, welche Resistenzen aus *Ae. kotschyi* beinhalten sollte, mittels visueller Bonitur nach Inokulation im Gewächshaus charakterisiert wurde. Basierend auf diesen phänotypischen Daten erfolgte die Identifikation molekularer Marker mittels AFLP und SSR Analysen.

Ergebnisse und Diskussion

Real-Time PCR-Methode

Bei der Analyse von Feldproben mittels Real-time-PCR und Bonitur konnte 2006 eine Korrelation zu den Boniturdaten von 0,4** und 0,6** an den Standorten Hadmersleben und Söllingen für den Nachweis von OY ermittelt werden. Nach Optimierung der Probenaufbereitung für die Real-time-PCR Analysen ergaben sich im folgenden Jahr Korrelationen zwischen Bonitur und OY-PCR von 0,61** und 0,87** für diese Standorte. Für den Gehalt an OA-DNA in den inokulierten Pflanzen konnten keine signifikanten Korrelationen zur Feldbonitur nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Tatsache wurde ein Gewächshausversuch durchgeführt. Dort konnten signifikante Unterschiede in den Gehalten an Pathogen-DNA zwischen Genotypen mit verschiedenem Resistenzniveau (*Pch1*, *Pch2*, anfällig), sowohl für die Inokulation mit OA als auch mit OY, ermittelt werden. Die eindeutigste Differenzierung zwischen Genotypen verschiedener Resistenzniveaus konnte 12 Wochen nach Inokulation mit OY nachgewiesen werden (Tabelle 1). Das der Nachweis von OA und OY mittels Real-time PCR möglich ist, zeigt auch WALSH et al. (2005). Weiterhin konnte beim Vergleich verschiedener Phänotypisierungsmethoden für Haferkronenrost nachgewiesen werden, dass die Ermittlung der PathogenDNA durch Real-time PCR als Grundlage für die Entwicklung molekularer Marker die sichersten Ergebnisse liefert (JACKSON et al. 2007). Da es sich bei dem vorgestellten Verfahren um ein SYBR® Green basiertes System handelt ist es zudem kostengünstig.

Entwicklung molekularer Marker

Pch1

Nach Charakterisierung der DH-Linien mittels Isoelektrischer Fokussierung erfolgte unter Verwendung der Bulkcd Segregant Analysis (BSA) und 256 AFLP Kombinationen

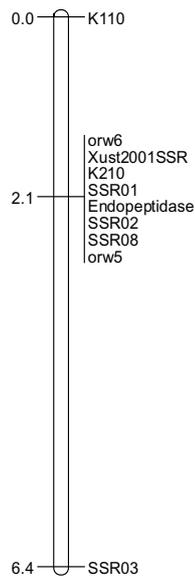


Abbildung 1: Kopplungsgruppe auf Chromosom 7D für die Population BAZ7/10 berechnet mit JoinMap 4.0. Endopeptidase *EpD1b* cosegregiert mit 1 AFLP-Marker (K210) und mehreren SSR-Markern.

(*EcoR1xMseI*) und SSRs, die auf dem Chromosom 7A lokalisiert sind, die Identifikation molekularer Marker. Es konnten 3 SSR-Marker und 1 AFLP-Fragment identifiziert werden, die mit der Endopeptidase *EpD1b* cosegregieren, und es konnte ein AFLP-Fragment mit einer Rekombination zur Endopeptidase identifiziert werden (Abbildung 1). Weiterhin wurden in diese Analysen die jüngst von CHAPMAN et al. (2008) publizierten Marker *orw6* und *orw5* einbezogen, die ebenfalls mit der Endopeptidase *EpD1b* cosegregieren. Weiterhin zeigte SSR02 zusätzlich in weiteren Population eine sehr enge Kopplung mit der Endopeptidase *EpD1b*, während andere Marker, wie der bislang genutzte *Xust2001SSR*, in diesen monomorph waren.

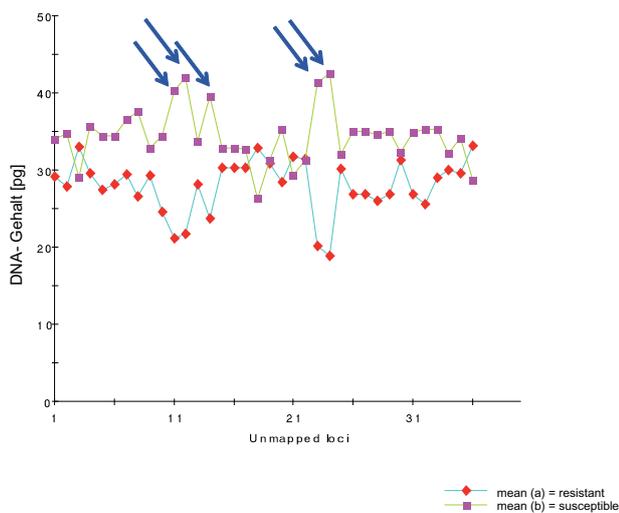


Abbildung 2: Mittelwertvergleich nach Krustal-Wallis für 36 Polymorphismen zwischen anfälligen und resistenten Bulks gegenüber *Oculimacula* spp. 5 AFLP-Fragmente (Pfeil) zeigen hochsignifikante Unterschiede im Mittelwertvergleich.

Pch2

Nach der Ermittlung des Resistenzniveaus der DH-Linien durch die Charakterisierung mit Real-time PCR wurden jeweils zwei anfällige und zwei resistente Bulks für molekulare Analysen zusammengestellt. Nach der Analyse von 256 AFLP-Primerkombinationen und zusätzlichen SSRs von Chromosom 7A konnten 27 polymorphe AFLP-Fragmente und 9 polymorphe SSRs identifiziert werden. Nach Analyse der gesamten DH-Population zeigten 5 AFLP-Fragmente im Krustal-Wallis Test signifikante Unterschiede im Mittelwertvergleich zwischen resistenten und anfälligen DH-Linien dieser Population (Abbildung 2).

Ae. kotschyi

Da über die Lokalisation der Resistenz aus *Ae. kotschyi* bisher noch keine Erkenntnisse vorlagen, erfolgte ein genomweites SSR-Screening auf resistenten und anfälligen Bulks, die nach 5 Resistenztestungen mit jeweils 3 Wiederholungen zusammengestellt wurden. Die Analysen zeigten einige wenige Polymorphismen, insbesondere auf Chromosom 1A und 1B, jedoch konnte nach der Analyse aller DH-Linien und anschließendem Mittelwertvergleich keine Kopplung dieser Marker zu der *Ae. kotschyi* Resistenz nachgewiesen werden. In anschließenden zytogenetischen Analysen zum Nachweis einer Introgression aus *Ae. kotschyi* konnte diese bisher nicht nachgewiesen werden. Eine Grund hierfür könnte sein, dass neuere Ergebnisse im Gegensatz zu THIELE et al. (2002) darauf hinweisen, dass die Resistenz aus *Ae. kotschyi* nur einen geringen Effekt hat (LIND unveröffentlicht), der u.U. durch mehrere Minorgene bedingt ist, die mit dem bisherigen Verfahren der Phänotypisierung nicht detektiert werden können.

Danksagung

Wir danken der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP) und dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie über die AiF für die finanzielle Unterstützung dieses Vorhabens (AiF-Nr. 14475 BR/1 rt). Herrn Dr. RICHTER und Herrn Dr. KAZMAN von SW Seeds Hadmersleben GmbH und Herrn Dr. SPANAKAKIS und Herrn Dr. WELZ von Fr. Strube KG danken wir für die Bereitstellung der Boniturwerte. Weiterhin möchten wir uns bei den Firmen Deutsche Saatveredelung AG und Saaten Union Resistenzlabor GmbH für die Bereitstellung der DH-Populationen bedanken.

Literatur

- BANG, R., 1986: Experimentelle Untersuchungen zur genetischen Analyse und zur Verbesserung der Widerstandsfähigkeit des Saatweizens *Triticum aestivum* L. gegenüber *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 141 S.
- CHAPMAN, N.H., C. BURT, H. DONG and P. NICHOLSON, 2008: The development of PCR-based markers for the selection of eyespot resistance genes *Pch1* and *Pch2*. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 425-433.
- FREIER, U., 1982: Prüfung von *Aegilops*-Arten auf Resistenz gegen *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton. Dissertation A, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- LI, H.J., M. ARTERBURN, S.S. JONES and T.D. MURRAY, 2004: A New Source of Resistance to *Tapesia yallundae* Associated with a Homoeologous Group 4 Chromosome in *Thinopyrum ponticum*. *Phytopathology* 94, 932-937.
- JACKSON, E.W., D.E. OBERT, M. MENZ, G. HU, J.B. AVANT, J. CHONG and J.M. BONMAN, 2007: Characterization and mapping of oat crown rust resistance genes using three assessment methods. *Phytopathology* 97: 1063-1070.
- MAIA, N., 1967: Obtention de blés tendres résistants au piétin-verse par croisements interspécifiques blés x *Aegilops*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie de l'Agriculture de France* 53, 149-154.
- MEYER, N., P. KARLOVSKY, M. ZAHN, V. LIND, I. KRÄMER, F. ORDON, 2006: Quantifizierung des Befalls von *Oculimacula aciformis* und *Oculimacula yallundae* als Grundlage zur Entwicklung molekularer Marker für Resistenzgene gegenüber der Halmbruchkrankheit bei *Triticum aestivum*. *Pflanzenzüchtung und Genomanalyse, Bericht über die 57. Pflanzenzüchertagung, 21.-23.11.2006, Gumpenstein, Österreich, S. 112.*
- MIELKE, H., 1995: Studien zum Befall des Weizens mit *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton unter Berücksichtigung der Sorten- und Artenanfälligkeit sowie der Bekämpfung des Erregers. *Mitteil. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem, H. 314, 197 S.*
- McMILLIN, D.E., R.E. ALLAN and D.E. ROBERTS, 1986: Association of an isozyme locus and strawbreaker foot rot resistance derived from *Aegilops ventricosa* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 72, 743-747.
- De la PEÑA, R.C., T.D. MURRAY and S.S. JONES, 1997: Identification of an RFLP interval containing *Pch2* on chromosome 7AL in wheat. *Genome* 40, 249-252
- THIELE, A., E. SCHUMANN, A. PEIL and W.E. WEBER, 2002: Eyespot resistance in wheat *Aegilops kotschy* backcross lines. *Plant Breeding* 121, 29-35.
- WALSH, K., J. KORIMBOCUS, N. BOOHAM, P. JENNINGS and M. HIMS, 2005: Using Real-time PCR to Discriminate and Quantify the Closely Related Wheat Pathogens *Oculimacula yallundae* and *Oculimacula aciformis*. *Journal of Phytopathology* 153: 715-721.
- YILDIRIM, A., S.S. JONES and T.D. MURRAY, 1998: Mapping a gene conferring resistance to *Pseudocercospora herpotrichoides* on chromosome 4V of *Dasyphyrum villosum* in a wheat background. *Genome* 41, 1-6.