

Kartierung der Braunrostresistenz in einer Kreuzungspopulation aus Capo x Isengrain

Mapping of leaf rust resistance in a Capo x Isengrain population

Lydia Matiasch^{1*}, Katharina Herzog¹, Ján Kraic², Valéria Šudyová², Svetlana Šliková²,
Franziska Löschenberger³, Marion Marn³, Julia Lafferty³, Maria Buerstmayr¹, Hermann Buerstmayr¹

Abstract

The fungal disease leaf rust, caused by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, is occurring wherever wheat is grown. The best option to reduce yield losses due to earlier senescence of leaves is the cultivation of resistant varieties. Leaf rust resistance can be based upon one or more major genes (*Lr*-genes) and/or minor resistance genes acting quantitatively (quantitative trait loci, QTL). Capo is an Austrian winter wheat cultivar grown for 20 years with still low susceptibility to leaf rust. It seems to possess durable adult plant leaf rust resistance (APR). As this type of resistance can not be tested on seedling plants, molecular markers could facilitate early selection of new resistant varieties. 240 F_{6,7} recombinant inbred lines (RILs) of the cross Capo x Isengrain have been tested over a period of 6 years on different locations. A QTL for leaf rust severity inherited from Isengrain could be detected at all experiments. Whether this is *Lr14a*, previously detected in seedling tests, needs further investigation, as Thatcher NILs with *Lr14a* were rather susceptible. One minor QTL inherited from Capo could only be detected in a few experiments. We could prove that *Lr34*, a gene conferring APR, is not present in Capo. Diversity array technology (DArT) marker will be added to the present microsatellite (SSR) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) map. Two further Capo cross derived populations are also under investigation.

Keywords

Puccinia recondita, QTL mapping, *Triticum aestivum*

Einleitung

Braunrost, hervorgerufen durch den Pilz *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, ist eine weltweit verbreitete Krankheit von Weizen. Ein starker Befall führt aufgrund der verfrühten Blattseneszenz zu Ertragseinbußen. In Österreich ist dieser Pilz besonders im Osten, im pannonischen Trockengebiet, verbreitet. Hier sind Reduktionen des Kornertrags von bis zu 20 % möglich (ZWATZ 1998). Vielfach ist der Einsatz von Fungiziden jedoch nicht wirtschaftlich bzw. im öko-

logischen Landbau überhaupt nicht zulässig. Daher ist der Anbau resistenter Sorten von großer Bedeutung.

Braunrostresistenz kann zwei Ursachen haben: Die Resistenz beruht entweder auf einem oder wenigen Hauptgenen (*Lr*-Gene) oder auf sogenannten QTLs (quantitative trait loci). Bisher sind über 50 *Lr*-Gene beschrieben (MACINTOSH 1995, MCINTOSH et al. 1995, SCHNURBUSCH et al. 2004). Nur wenige davon gelten als dauerhaft, so zum Beispiel *Lr46* (SINGH et al. 1998) und *Lr34* insbesondere in Kombination mit *Lr12* oder *Lr13* (ROELFS 1988). Gegenüber den meisten anderen bekannten *Lr*-Genen sind früher oder später virulente Pilzrassen aufgetreten, sodass diese heute nicht mehr bzw. nur mehr regional wirksam sind. Als dauerhafter haben sich quantitative Resistenzen der erwachsenen Pflanze erwiesen. Diese führen nie zu einer vollständigen Resistenz, sondern sie bewirken z.B. eine längere Latenzperiode, eine langsamere Ausbreitung auf der Pflanze oder eine geringere Sporulationsfähigkeit. Dadurch sind die Pflanzen nicht völlig befallsfrei, weshalb auch der Selektionsdruck auf den Pilz geringer ist.

Braunrostresistenz kann nur in aufwändigen Inokulationsversuchen getestet werden. Sämlingstests sind nicht ausreichend, wenn die Resistenz erst in der erwachsenen Pflanze wirksam ist (APR, adult plant resistance). Deshalb könnten molekulare Marker für *Lr*-Gene bzw. QTLs die praktische Pflanzenzüchtung vereinfachen. Schon in einem sehr frühen Züchtungsstadium können große Pflanzenzahlen in kurzer Zeit vorselektiert werden, da dazu nur DNS (Desoxyribonukleinsäure) von wenigen Blättern notwendig ist.

Material und Methoden

Untersucht wurden 240 Inzuchtlinien (RILs, recombinant inbred lines), (F_{6,7}) der Kreuzung Capo x Isengrain. Die von Hermann Hänsel gezüchtete und 1989 zugelassene Qualitätswinterweizensorte Capo (Pokal/Martin) der Probstdorfer Saatzucht scheint dauerhaft braunrostresistent zu sein. Im Jahr der Zulassung wurde ihre Anfälligkeit gegenüber Braunrost auf einer Skala von 1 (fehlend/sehr gering) - 9 (sehr stark) mit 2 (sehr gering bis gering) beurteilt, bis vor wenigen Jahren mit 3 (gering) und erst seit kurzem wird sie

¹ Universität für Bodenkultur Wien, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

² Research Institute of Plant Production, Bratislavská cesta 122, SK-921 68 PIEŠŤANY

³ Saatzucht Donau GesmbH & CoKG, Saatzuchtstrasse 11, A-2301 PROBSTDORF

* Ansprechpartner: Dipl.-Ing. Lydia MATIASCH, lydia.matiasch@boku.ac.at

mit 4 (gering bis mittel) eingestuft (AGES 2009). Außerdem zeigt sie eine sehr geringe Anfälligkeit gegenüber Gelbrost (*Puccinia striiformis*) sowie mittlere Anfälligkeit gegenüber Mehltau (*Erysiphe graminis*) und Septoria (*Septoria* spp.). Aufgrund der Summe seiner agronomischen Eigenschaften ist Capo auch 20 Jahre nach seiner Zulassung immer noch die dominante Qualitätswinterweizensorte in Österreich. Sie macht fast ein Viertel der Vermehrungsfläche für Z-Saatgut aus. Im pannonischen Trockengebiet bzw. für den ökologischen Landbau macht Capo sogar ca. ein Drittel der Fläche aus, das ist mehr als die Flächen der nächsten drei Sorten zusammen (BAES 2009). In Sämlingstests wurde in Capo *Lr13* nachgewiesen (WINZELER et al. 2000). Dieses allein ist allerdings in weiten Teilen Europas nicht mehr wirksam und erklärt damit nicht die geringe Anfälligkeit dieser Sorte (MESTERHÁZY et al. 2000). In einem ersten Schritt sollte abgeklärt werden, ob Capo zusätzlich *Lr34* hat, das in Sämlingstests nicht gut untersucht werden kann (MESTERHÁZY et al. 2002), da es erst in der erwachsenen Pflanze wirksam ist. Capo zeigt allerdings nicht die typische Blattspitzendürre, die mit *Lr34* eng gekoppelt ist (SINGH 1992). Isengrain (Apollo/Soissons) ist eine französische Weizensorte, gezüchtet von Florimond Desprez. Aufgrund ihrer Anfälligkeit gegenüber Braunrost wurde sie als Kreuzungspartner gewählt.

In den Jahren 2004 bis 2009 wurden die 240 RILs sowie die Eltern- und Standardlinien in insgesamt 18 Versuchen auf 6 Standorten (Aumühle, Tulln und Rust im Tullnerfeld; Schmida bei Hausleitern im Bezirk Korneuburg; Probstdorf im Marchfeld; Piešťany in der Slowakei) getestet. Das Versuchsdesign war eine vollständig randomisierte Blockanlage mit 2 Wiederholungen. Um einen gleichmäßigen Krankheitsdruck auf der gesamten Versuchsfläche zu gewährleisten und auch um diesen überprüfen zu können,

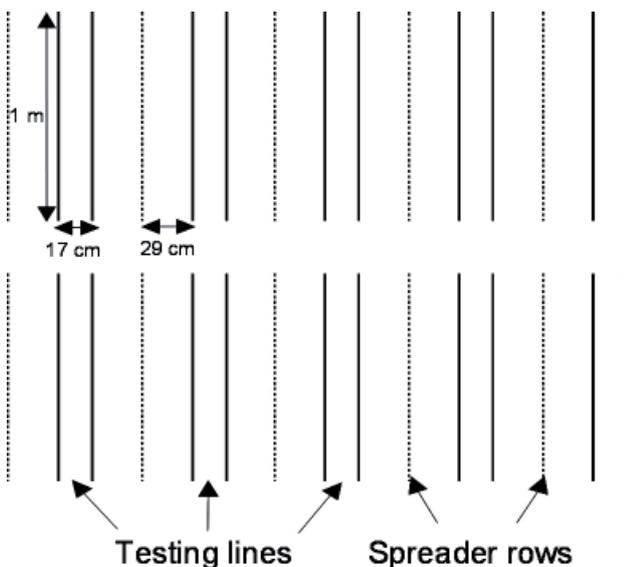


Abbildung 1: Versuchsdesign. Links und rechts jeder Doppelreihe einer Prüflinie befindet sich ein Infektionsstreifen aus einem Gemisch braunrostanfälliger Sorten.

Figure 1: Experimental design. Left and right of each double row of testing lines is a spreader row of leaf rust susceptible cultivars.

wurde jeweils links und rechts der Doppelreihe jedes Prüfglieds ein sogenannter Infektionsstreifen angebaut (Abbildung 1). Hierfür wurde ein Gemisch braunrostanfälliger Sorten verwendet.

Verschiedene künstliche Inokulationsmethoden wurden ausprobiert: Auspflanzen von infizierten Sämlingspflanzen, die zuvor im Glashaus durch Ansprühen mit einer wässrigen Sporensuspension inokuliert wurden, in die Infektionsstreifen; Injektion der Sporensuspension direkt in die Blattscheide von Pflanzen in den Infektionsstreifen; flächendeckendes Sprühen einer ölbasierten Sporensuspension mit ULVA+ (Micron Sprayer Ltd., Bromyard, Herefordshire, UK). Am effektivsten war das direkte Ansprühen einer Pflanze je Infektionsstreifen während des Bestockens (BBCH 20-29) am späten Nachmittag mit ca. 2 ml einer wasserbasierten Sporensuspension (ca. 10 Mio. Sporen/ml) und anschließender Abdeckung über Nacht.

Für die Bonitur wurde das Schema von Abbildung 2 verwendet, wobei die Skala, sofern notwendig, in 10er Schritten bis 100 % Befall erweitert wurde.

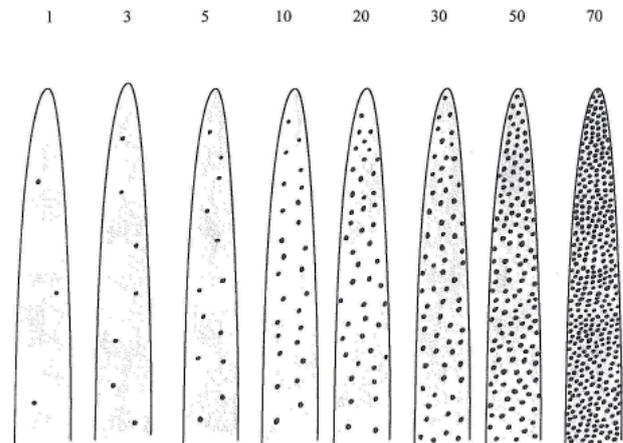


Abbildung 2: Boniturschema zur Schätzung des Prozentanteils mit Braunrost befallener Blattfläche (MOLL et al. 1996; zitiert in BARTELS und BACKHAUS 2000)

Figure 2: Scoring aid for estimating percentage of leaf rust infected leaf area

Der Befall mit Braunrost war leider nicht in allen Jahren ausreichend stark bzw. früh genug, um bonitiert werden zu können bzw. ausreichend zu differenzieren. Deshalb konnten für die weiteren Berechnungen nur die Daten von 11 Versuchen verwendet werden.

Parallel dazu wurde die Population mit molekularen Markern (SSR, simple sequence repeats; AFLP, amplified fragment length polymorphism) charakterisiert. Die Berechnung der aktuellen genetischen Karte basiert auf 130 SSR- und 483 AFLP-Markern. Verwendet wurde JoinMap® Vers. 4 mit Evaluation License (Haldane's mapping function, ansonsten Grundeinstellungen). Die resultierenden Kopplungsgruppen decken alle Chromosomen ab. Die anschließende QTL-Analyse erfolgte mit dem Programm Cartographer® Vers. 2.5. Für die Auswertung der Feldversuche mittels Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variances) bzw. die Einzelmarker-ANOVA wurde das Programm SAS® Vers. 9.2 TS Level 1M0 verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse lässt sich ausschließen, dass Capo *Lr34* enthält. Die beiden bei SUENAGA et al. (2003) für dieses Resistenzgen beschriebenen Marker *Xgwm130* und *Xgwm295* wurden auch in dieser Population auf Chromosom 7D in geringem Abstand kartiert. Die Allele unterscheiden sich nicht signifikant hinsichtlich des Braunrostbefalls (MATIASCH et al. 2007). Boxplots der Population für die Allele der beiden Eltern Capo (C) und Isengrain (I) sowie Heterozygote (H) von *Xgwm130* sind in *Abbildung 3* gezeigt. Die Verteilung des Braunrostbefalls (Mittelwert über alle 11 Experimente) ist für alle 3 Allelgruppen nahezu ident.

Der bisher stärkste gefundene QTL konnte auf Chromosom 7BL lokalisiert werden. Diese Resistenz wird von Isengrain vererbt. In Sämlingstests konnte bereits von BLASZCZYK et al. (2004) *Lr14a* in Isengrain nachgewiesen werden. Sowohl Isengrain selber als auch Thatcher NILs mit *Lr14a* und *Lr14b* waren im Versuch in Tulln 2007 mit bis zu 60 % befallener Blattfläche wesentlich stärker infiziert als die RILs mit dem entsprechenden Isengrain-Allel. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen VIDA et al. (2009). Der Koeffizient durchschnittlichen Befalls lag für *Lr14a* bei fast 90 %, für *Lr14b* bei 60 %. Hingegen zeigten Thatcher NILs mit *Lr19* weder in Tulln noch in Martonvásár (VIDA et al. 2009) Befall mit Braunrost. Bei Durum wurde *Lr19*, das ursprünglich aus *Agropyron elongatum* (syn. *Thynopyrum ponticum*) (CHERUKURI et al. 2003) stammt, auf Chromosom 7B eingekreuzt. Ein Vergleich der Isengrain-Allele der in der Population signifikanten Marker mit denen von verschiedenen Sorten, für die *Lr14a* bzw. *Lr19* nachgewiesen wurde, ist auf jeden Fall noch notwendig, um diesen QTL besser einordnen zu können.

Für Capo konnte bisher nur ein QTL gefunden werden, der über dem Grenzwert liegt. Dieser ist jedoch nicht in allen Versuchen signifikant. Dass kein stärkerer QTL gefunden wurde, könnte daran liegen, dass die Karte in einzelnen Bereichen noch nicht ausreichend dicht ist. Deshalb werden aktuell noch zusätzlich DArT (diversity array technology) Marker gemacht, um die Kopplungskarte zu verfeinern.

Eine andere Ursache könnte sein, dass für die Resistenz von Capo sehr viele Gene verantwortlich sind, von denen jedes einzelne nur einen derart geringen Beitrag leistet, dass sie in der Kreuzungspopulation mit Isengrain nicht als QTL erkennbar sind. Zwei weitere Kreuzungspopulationen - Arina x Capo und Furore x Capo - sollen noch mit genetischen Markern charakterisiert werden. Es ist zu erwarten, dass Capo QTLs aufgrund der stärkeren Braunrostanfälligkeit der Kreuzungspartner verglichen mit Isengrain besser zu sehen sind.

Danksagung

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Projekte wurden unterstützt vom Österreichischen Fonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung (FWF) Projektnummer L182-B06, sowie im Rahmen von INTERREG IIIA Österreich-Slowakei (Kofinanziert vom Europäischen Fonds für Regionale Entwicklung (EFRE) der Europäischen Union und der niederösterreichischen Landesregierung). Vielen Dank

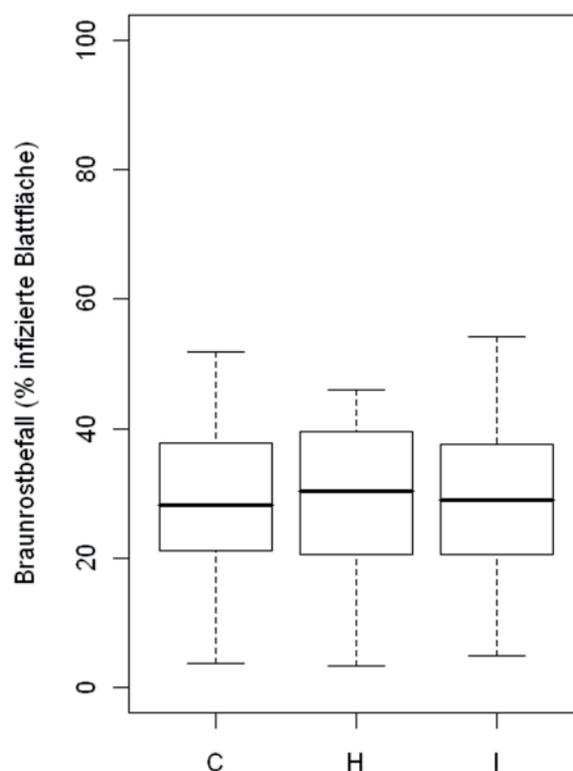


Abbildung 3: Boxplotdarstellung des Braunrostbefalls (Mittelwert über alle 11 Experimente) der 240 RILs der Kreuzung Capo x Isengrain. Die Gruppen sind getrennt nach den Allelen C (Capo), H (Heterozygot) und I (Isengrain) für Mikrosatellitenmarker *Xgwm130*. Mittelwert für Capo 26,7 %, Isengrain 35,5 %

Figure 3: Boxplots for leaf rust infection (mean over all 11 experiments) of the 240 Capo x Isengrain RILs. Groups are separated for the alleles C (Capo), H (heterozygous) and I (Isengrain) of microsatellite marker *Xgwm130*. Mean of Capo 26.7 %, Isengrain 35.5 %

an die zahlreichen Helferinnen und Helfer für die wichtige Unterstützung bei der künstlichen Inokulation, Matthias Fidesser für die Durchführung aller pflanzenbaulichen Feldarbeiten sowie allen Projektpartnern für die Betreuung von Versuchen.

Literatur

- AGES, 2009: Österreichische beschreibende Sortenliste 2009, Landwirtschaftliche Pflanzenarten, Schriftenreihe 21/2009. Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Wien.
- BAES, 2009: Feldanerkennungsflächen der Saison 2007/2008 (Ernte 2008). Bundesamt für Ernährungssicherheit, Wien [Available online: <http://www.baes.gv.at/saat-pflanzgut/statistiken/feldanerkennungs-flaechen/>; accessed 20 Nov 2009].
- BARTELS G, BACKHAUS GF, 2000: Die Prüfung von Pflanzen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Schadorganismen in der Biologischen Bundesanstalt. Teil 2: Resistenzprüfungen von Kulturpflanzen im Acker- und Gartenbau gegen Pilze, Bakterien und Viren. Mitt Biol Bundesanst Land- Forstwirtschaft 373. Paul Parey, Berlin.
- BLASZCZYK L, GOYEAU H, HUANG XQ, RÖDER M, ŚTEPIEŃ Ł, CHELKOWSKI J, 2004: Identifying leaf rust resistance genes and mapping gene *Lr37* on the microsatellite map of wheat. Cell Mol Biol Lett 9, 869-878.

- CHERUKURI DP, GUPTA SK, CHARPE A, KOUL S, PRABHU KV, SINGH RB, HAQ QMR, CHAUHAN SVS, 2003: Identification of a molecular marker linked to an *Agropyron elongatum*-derived gene *Lr19* for leaf rust resistance in wheat. *Plant Breeding* 122, 204-208.
- MATIASCH L, HERZOG K, KRAIC J, ŠUDYOVÁ V, ŠLIKOVÁ S, LÖSCHENBERGER F, LAFFERTY J, BÜRSTMAYR H, 2007: Molecular genetic analysis of durable adult plant leaf rust resistance in the Austrian winter wheat cultivar 'Capo'. In: Bericht der 57. Jahrestagung 2006 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, p 111. HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Irdning.
- MCINTOSH RA, WELLINGS CR, PARK RF, 1995: Wheat rusts - an atlas of resistance genes. Kluwer Acad Publ, Dordrecht.
- MESTERHÁZY Á, BARTOŠ P, GOYEAU H, NIKS RE, CSÖSZ M, ANDERSEN O, CASULLI F, ITTU M, JONES E, MANISTERSKI J, MANNINGER K, PASQUINI M, RUBIALES D, SCHACHERMAYR G, STRZEMBICKA A, SZUNICS L, TODOROVA M, UNGER O, VANCO B, VIDA G, WALTHER U, 2000: European virulence survey for leaf rust in wheat. *Agronomie* 20, 793-804.
- MESTERHÁZY Á, WINZELER M, PARK RF, BARTOŠ P, GOYEAU H, 2002: Europäische Virulenzverteilung in Braunrost des Weizens und Resistenzgene in Europa. In: Bericht der 52. Tagung 2001 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, pp 25-36. BAL Gumpenstein, Irdning.
- MOLL E, WALTHER U, FLATH K, PROCHNOW J, SACHS E, 1996: Methodische Anleitung zur Bewertung der partiellen Resistenz und die SAS-Anwendung RESI. Ber Biol Bundesanst Land- Forstwirtsch 12. Saphir, Ribbesbüttel.
- ROELFS AP, 1988: Resistance to leaf rust and stem rust in wheat. In: Simmonds NW, Rajaram S (eds), *Breeding strategies for resistance to the rusts of wheat*, 10-22. CIMMYT, México.
- SCHNURBUSCH T, PAILLARD S, SCHORI A, MESSMER M, SCHACHERMAYR G, WINZELER M, KELLER B, 2004: Dissection of quantitative and durable leaf rust resistance in Swiss winter wheat reveals a major resistance QTL in the *Lr34* chromosomal region. *Theor Appl Genet* 108, 477-484.
- SINGH RP, MUJEEB-KAZI A, HUERTA-ESPINO J, 1998: *Lr46*: a gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathol* 88, 890-894.
- SINGH RP, 1992: Association between gene *Lr34* for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in wheat. *Crop Sci* 32, 874-878.
- SUENAGA K, SINGH RP, HUERTA-ESPINO J, WILLIAM HM, 2003: Microsatellite markers for genes *Lr34/Yr18* and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathol* 93, 881-890.
- VIDA G, GÁL M, UHRIN A, VEISZ O, SYED NH, FLAVELL AJ, WANG Z, BEDŐ Z, 2009: Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica* 170, 67-76.
- WINZELER M, MESTERHÁZY Á, PARK RF, BARTOŠ P, CSÖSZ M, GOYEAU H, ITTU M, JONES E, LÖSCHENBERGER F, MANNINGER K, PASQUINI M, RICHTER K, RUBIALES D, SCHACHERMAYR G, STRZEMBICKA A, TROTTET M, UNGER O, VIDA G, WALTHER U, 2000: Resistance of European winter wheat germplasm to leaf rust. *Agronomie* 20, 783-792.
- ZWATZ B, CATE P, BERGER HK, 1998: Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge im Getreide- und Maisbau, 4. Aufl. Jugend und Volk, Wien.