

# Genetische Analyse neuer Resistenzressourcen für Anthraknose-Resistenz in der Blauen Süßlupine (*Lupinus angustifolius* L.) und die Entwicklung molekularer Marker

## Sources of resistance and development of molecular markers for anthracnose resistance in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.)

Brigitte Ruge-Wehling<sup>1</sup>, Christoph Thiele<sup>2</sup>, Regine Dieterich<sup>2</sup>, Fred Eickmeyer<sup>2</sup> und Peter Wehling<sup>1</sup>

### Abstract

Anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum lupini*, is among the most important lupin diseases. For the time being, fungicide application and seed treatment are necessary to prevent *C. lupini* infection in the field. Alternatively, resistance genes directed to *C. lupini* may be identified and used in this lupin species. To this end, a marker-assisted approach was followed to transfer the resistance gene *Lanr1* from Australian into German lupin germplasm. Additionally, genebank accessions were screened for novel anthracnose resistances by use of a reliable and standardized resistance test. Three accessions were identified which displayed strong resistance to *C. lupini*. One of them (Bo7212) was tested in the field and strong resistance could be confirmed. From the novel resistance resources, segregating mapping populations are being developed for genetic and molecular marker analysis. Greenhouse tests of two F<sub>2</sub> mapping populations indicated a dominant inheritance of the resistance. The reaction of Bo7212 observed under infection pressure in field trials was different from that of the Australian cv. Tanjil. This difference as well as the divergent pedigrees of the two entries let us assume that Bo7212 carries an anthracnose resistance gene different from *Lanr1* in Tanjil. For mapping purposes, 150 gene-based molecular markers were kindly provided by M. Nelson (University of Western Australia, Perth). Sequence information of the *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and *Pisum sativum* model genomes will be used to develop closely linked markers for anthracnose resistance in narrow-leafed lupin.

### Keywords

*Colletotrichum lupini*, narrow-leafed lupin, marker development, resistance

### Einleitung

Unter den in Deutschland anbauwürdigen großkörnigen Leguminosen sticht die Lupine mit durchschnittlich 30-45% Rohprotein im Samen heraus, das dank des Anteils an den

essenziellen Aminosäuren Tryptophan und Methionin als ernährungsphysiologisch hochwertig gilt. Als Stickstoff-Fixierer und Pfahlwurzler hat die in Deutschland fast ausschließlich angebaute Blaue Lupine (*Lupinus angustifolius* L.) einen guten Vorfruchtwert; sie kann dank ihres ausgedehnten Wurzelsystems besonders gut die im Boden vorhandenen Phosphate als Nährstoff akquirieren und auch auf leichteren, trockeneren Standorten gedeihen. Das Samenprotein der Blauen Süßlupine ist wegen seiner günstigen Eigenschaften nicht nur für Futterzwecke, sondern auch im Lebensmittelbereich einsetzbar, wenn es etwa um die Substitution von Soja-Eiweiß oder tierischem Eiweiß in Back-, Teig- und Wurstwaren, Saucen, Eiscremes, Süßwaren usw. geht. Trotz der agrarökologisch und ernährungsphysiologisch interessanten Eigenschaften dieser Fruchtart ist ihre Anbaufläche in Deutschland in den vergangenen Jahren deutlich geschrumpft, und mittlerweile gibt es nur noch einen deutschen Sortenzüchter, der sich mit dieser Kulturart befasst.

Eine wichtige Voraussetzung für die gesicherte Weiterverarbeitung der proteinhaltigen Körner ist die Ernte von gesundem Erntegut, um eine optimale Proteinausbeute für die Industrie zu erzielen. Allerdings wird die Blaue ebenso wie die Weiße und die Gelbe Lupine von dem pilzlichen Erreger der Anthraknose, *Colletotrichum lupini*, befallen, der Ertragseinbußen bis hin zum Totalverlust verursachen kann. Diese Krankheit führte dazu, dass der Anbau der besonders anfälligen Gelben und Weißen Lupinen ab Mitte der 1990er Jahre hierzulande praktisch zum Erliegen kam und durch den Anbau der vergleichsweise toleranteren Blauen Lupine abgelöst wurde. Allerdings erweisen sich bei künstlicher Inokulation mit dem Erreger auch die in Deutschland angebauten Sorten der Blauen Lupine, die vornehmlich aus demselben genetischen Pool stammen, als anfällig gegen Anthraknose (RUGE-WEHLING, unveröff.).

Bislang konnte ein Resistenzgen, *Lanr1*, in der australischen Sorte Tanjil identifiziert werden (YANG et al. 2004). Die durch dieses Gen bedingte Resistenz wird dominant vererbt und wird mit Hilfe eng gekoppelter Marker (YOU et al. 2005) in australischen Züchtungsprogrammen bereits gezielt genutzt. Als ebenfalls resistent wird die australische Sorte

<sup>1</sup> Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, D-18190 GROSS LÜSEWITZ

<sup>2</sup> Saatzucht Steinach, Station Bornhof, Klockower Str. 11, D-17219 BOCKSEE

\* Ansprechpartner: Dr. Brigitte RUGE-WEHLING, brigitte.ruge-wehling@jki.bund.de

Mandelup beschrieben (YANG et al. 2008). Ob in dieser Sorte ein anderer Resistenzfaktor vorliegt als in Tanjil, ist noch nicht geklärt. Ziel unserer Arbeiten ist die Identifizierung und genetische Analyse neuer Resistenzen gegenüber Anthraknose sowie die Entwicklung molekularer Marker, die in 'Smart Breeding'-Ansätzen zur Beschleunigung des Züchtungsfortschritts in hiesigem Zuchtmaterial der Blauen Lupine eingesetzt werden können.

## Material und Methoden

### Pflanzenmaterial

Insgesamt 13 Sorten (Arabella, Bolivio, Bora, Bordako, Boregine, Boruta, Borweta, Haagena, Haags Blaue, Mandelup, Polonez, Tanjil, Vitabor), 15 Zuchtstämme der Saatzucht Steinach GmbH sowie 26 Genbankakzessionen standen für den Gewächshaus-Resistenztest zur Verfügung. Im Feldtest 2007 wurden die Versuchsglieder Tanjil, Arabella, Bo7212 und Bo3533 getestet, im Jahr 2009 ebenfalls Bo7212, Tanjil und Arabella, sowie Mandelup, Metel-1 und die Genbankakzession PI07014.

Die genetische Analyse der Resistenz wurde an Hand von zwei F<sub>2</sub>-Kartierungspopulationen durchgeführt, die auf Kreuzungen der anfälligen Sorte Arabella bzw. Haags Blaue mit dem Resistenzdonor Bo7212 zurückgehen.

### Resistenztests

Für den Gewächshausresistenztest wurde der Stamm BBA70358 des Pilzes *Colletotrichum lupini* var. *setosum* verwendet. Die Freilandversuche erfolgten mit einem Gemisch von insgesamt fünf Stämmen (BBA70400, BBA70397, BBA70358, BBA70385, BBA71238). Das Pathogen wurde freundlicherweise von H. I. Nirenberg (ehemals Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, BBA) zur Verfügung gestellt.

Der Gewächshausresistenztest wurde nach YANG et al. (2004) durchgeführt. Die Pflanzen wurden mit einer Konidiensuspension von 10<sup>5</sup> Konidien ml<sup>-1</sup> inokuliert. Nach 10-14 Tagen erfolgte die Bonitur. Symptomfreie Pflanzen, d.h. solche ohne Konidienlager im Stängelbereich, wurden als resistent, Pflanzen mit stark verdrehten Stängeln und Konidienlagern am Stängel als anfällig eingestuft.

Die Freilandversuche wurden in 2007 und 2009 in Bocksee (25 Bodenpunkte) und Groß Lüsewitz (47 Bodenpunkte) als randomisierte Blockanlagen in zweifacher Wiederholung durchgeführt. Zur Inokulation wurden mit *C. lupini* inkubierte Samen (15 Samen pro Reihe) der Sorte Arabella zwischen die Reihen der Versuchsglieder mit der Hand ausgelegt; dies erfolgte ca. 4 vier Wochen nach der Aussaat der Versuchsglieder. Die Samen von Arabella waren zuvor für 4 h in einer Konidiensuspension von 10<sup>5</sup> Konidien ml<sup>-1</sup> inkubiert und anschließend getrocknet worden. Die Bonitur erfolgte zu den drei Zeitpunkten Jungpflanzenstadium, Blüte und frühes Hülsenstadium. Es wurde eine qualitative Bonitur jeder Einzelpflanze in symptomfrei oder Stängel-, Blatt- bzw. Hülsenbefall vorgenommen. Der LSD-Test wurde mit Hilfe des Programms PLABSTAT (UTZ 2005) durchgeführt.

### Molekulare Marker

Die Sequenzinformation zu den PCR basierten *L. angustifolius* Markern (NELSON et al. 2006) wurde freundlicherweise von M. Nelson, University of Western Australia, Perth, zur Verfügung gestellt. Die Primer-Sequenzinformation zu den *Medicago-truncatula*-Markern wurde der Datenbank *mtgenome* (<http://www.medicago.org/genome/map.php>) entnommen. Mit Hilfe der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/>) wurden EST-Sequenzen aus *Lotus japonicus* in das Software-Programm SSRIT (<http://www.gramene.org/gramene/searches/ssritool>) zur Suche nach SSR Sequenzmotiven übertragen. Zur Primerentwicklung für die ESTs aus *L. japonicus* wurde die Software Prime3 (Rozen and Skaletsky 2000) verwendet. Die Primerinformation zur Etablierung von Markern aus *Pisum sativum* entstammt ebenfalls einer öffentlich zugänglichen Datenbank (<http://bioweb.abc.hu/cgi-mt/pisprim/pisprim.pl>).

Die PCR zur Darstellung der STS und SSR Marker aus *L. angustifolius*, *L. japonicus*, *P. sativum* bzw. *M. truncatula* wurde mit 50-100 ng genomischer DNA durchgeführt. Die Prä-PCR-Reaktion enthielt 1× Reaction Puffer (Qiagen), 200 µM dNTPs, 5 pmol Primer und 0,5 U *Taq* DNA-Polymerase (Qiagen). Die PCR-Produkte wurden in 2,5% Agarosegelen mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung oder in 10% Polyacrylamidgelen mit anschließender Silberbromid-Färbung nach BUDOWLE et al. (1991) aufgetrennt.

## Ergebnisse und Diskussion

### Identifizierung neuer Resistenzquellen

Das Resistenz-Screening im Gewächshaus zeigte, dass alle 11 untersuchten deutschen bzw. europäischen Sorten als hoch anfällig einzustufen sind. Nur die beiden australischen Sorten Tanjil und Mandelup zeigten Symptombfreiheit. Unter den insgesamt 15 getesteten Zuchtlinien erwiesen sich zwei (Bo7212, Metel-1) als resistent. Als resistent wurde auch die Genbankakzession PI07014 eingestuft. Als vollständig anfällig wurden 12 Zuchtlinien eingestuft. Lediglich die Linie Bo3533 erwies sich als toleranter Typ mit vereinzelt Läsionen im Bereich des infizierten Stängels.

In den Jahren 2007 und 2009 wurden ausgewählte Sorten und Zuchtlinien im Feld unter künstlichen Infektionsbedingungen getestet (*Abbildung 1*). Den signifikant stärksten Befall zeigte die Zuchtlinie Bo3533 mit fast 80% befallenen Pflanzen in Groß Lüsewitz 2007. Aufgrund ihrer hohen Anfälligkeit wurde diese Linie 2009 nicht mehr getestet. Auch die im Gewächshaus als potenziell resistent eingestufte Linie Metel-1 konnte dem im Feld über einen Zeitraum von mehreren Wochen anhaltenden Befallsdruck nicht standhalten und reagierte mit starkem Anthraknose-Befall. Die Genbankakzession PI07014 erwies sich als stark vernalisationsbedürftig (ca. 4 Wochen bei 4°C). Da insgesamt nur eine Wiederholung mit 213 Pflanzen dieser Akzession vernalisiert worden war, konnten die übrigen Parzellen aufgrund des vegetativ verharrenden Entwicklungsstadiums nicht in die Auswertung einbezogen werden. Tanjil und Mandelup, die unter australischen Anbaubedingungen als resistent eingestuft werden, erwiesen sich unter den mecklenburgischen Klimaverhältnissen mit 30-50% befallenen Pflanzen als

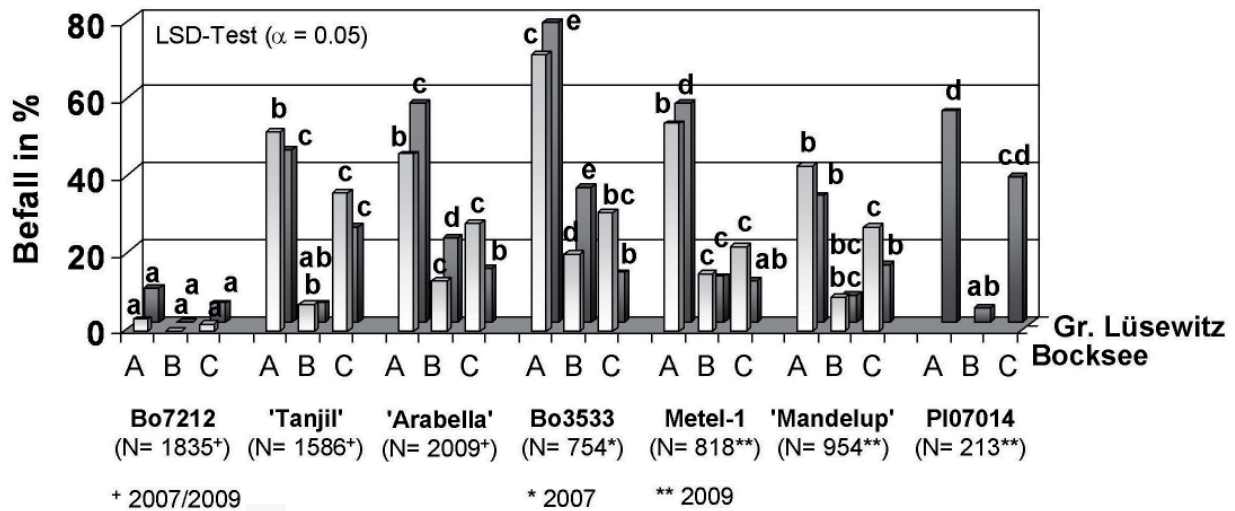


Abbildung 1: Freilandversuche zur Resistenz gegenüber Anthraknose an zwei Standorten über zwei Jahre (2007, 2009) bzw. einjährig in 2007 oder 2009. Signifikante Unterschiede im LSD-Test sind durch unterschiedliche Kleinbuchstaben dargestellt. (A, Gesamtanzahl infizierter Pflanzen; B, infizierte Pflanzen ohne Hülsenbildung; C, infizierte Pflanzen mit ausschließlich Hülsenbefall)

Figure 1: Field tests for anthracnose resistance at two locations and two years (2007, 2009) or annually at 2007 or 2009. Statistically significant differences are denoted by different lower case letters. (A, total amount of infected plants; B, infected plants without pods; C, pods infested only)

anfällig. Insbesondere Tanjil war im zweijährigen Feldversuch durch einen hohen Befall der Hülsen gekennzeichnet. Im Gegensatz zu den heißen und trockenen Sommern in Australien waren in unserem Feldversuch insbesondere im Jahr 2009 die Monate Juni und Juli mit bis zu 50 mm Niederschlag je Woche an beiden Versuchsorten eher feucht und kühl. Unter solchen Bedingungen verzögert sich häufig die Hülsenreife, und der Pilz kann sich auf der Hülse ausbreiten. Im Vergleich zu den übrigen sechs Versuchsgliedern zeigte sich die Zuchtlinie Bo7212 an den Versuchsorten Groß Lüsewitz und Bocksee über beide Versuchsjahre als signifikant weniger befallen.

### Kartierungspopulationen

Kreuzungen der anfälligen deutschen Sorten Haags Blaue und Arabella mit dem Resistenzdonor Bo7212 waren die Basis zum Aufbau von spaltenden Kartierungspopulationen. Der  $F_1$ -Charakter der Kreuzungsnachkommen wurde mittels molekularer Marker überprüft (RUGE-WEHLING et al. 2009).  $F_1$ -Kreuzungsnachkommen wurden unter isolierten Bedingungen geselbstet und die resultierenden  $F_2$ -Familien für die genetische Analyse und Suche nach molekularen Resistenzmarkern im Lupinengenom verwendet. Die Spaltungsverhältnisse von resistenten und anfälligen Pflanzen in den  $F_2$ -Familien 1021/1 und 1014/1 waren jeweils mit

Table 1: Segregation of anthracnose resistance in two  $F_2$  mapping populations

$F_2$ Familie	Eltern (anf. × res.)	Anzahl Individuen			$\chi^2_{3:1}$
		Gesamt	Resistent	Anfällig	
1021/1	Haags Blaue × Bo7212	114	79	35	2,0
1014/1	Arabella × Bo7212	133	100	33	0,003

Table 2: Verwendete Markerressourcen

Table 2: Used marker resources

Ressource	Anzahl Marker	
	Gesamt	Etabliert
<i>Lupinus angustifolius</i>	105	100
<i>Medicago truncatula</i>	30	30 <sup>1</sup>
<i>Lotus japonicus</i>	100	72
<i>Pisum sativum</i>	63	60

<sup>1</sup> z.T. multiple Fragmentmuster

einem 3:1-Verhältnis vereinbar und weisen somit auf einen monogenen und dominanten Erbgang der Anthraknose-Resistenz hin (Tabelle 1).

Da der Markerpolymorphismus in Zuchtmaterial der Blauen Lupine begrenzt ist, werden zurzeit zwei weitere Familien analysiert, die auf die Kreuzung des Resistenzdonors mit einer Genbankakzession als Rezipient zurückgehen.

### Molekulare Marker

Als Markerressourcen standen Primerinformationen aus vier verschiedenen Leguminosengenomen zur Verfügung (Tabelle 2). Das Screening auf Markerpolymorphismus wurde anhand der Eltern der Kartierungspopulationen durchgeführt. Im Gegensatz zu den meist kodominant auszuwertenden Markern aus der genetischen Karte von *L. angustifolius* (NELSON et al. 2006) und aus dem *P. sativum*-Genom (siehe z.B. Marker PS30 in Abbildung 2) zeigen die von *M. truncatula* bzw. *L. japonicus* abgeleiteten Marker fast ausschließlich dominant-rezessiven Erbgang (s. z.B. LJM7, Abbildung 2). Polymorphe Marker werden zurzeit für alle Individuen der Kartierungspopulation 1014/1 genotypisiert und auf eine mögliche Kopplungsbeziehung zur Resistenz analysiert.

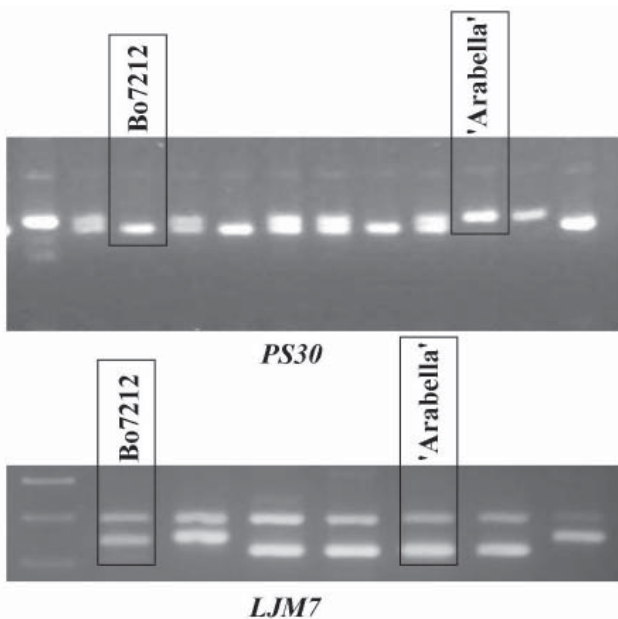


Abbildung 2: Polymorphe Marker aus den Genomen von *Pisum sativum* (oben) und *Lotus japonicus* (unten)

Figure 2: Polymorphic markers from *Pisum sativum* (above) and *Lotus japonicus* (below)

Das einzige bislang beschriebene Resistenzgen gegen Anthraknose in der Blauen Süßlupine ist *Lanr1* aus der Sorte Tanjil (YANG et al. 2004). In vorliegender Studie wird gezeigt, dass auch die deutsche Zuchtlinie Bo7212 über Anthraknoseresistenz verfügt, deren Ausprägung unter deutschen Anbauverhältnissen jene von Tanjil deutlich übersteigt. Die unterschiedliche Provenienz von Bo7212 und Tanjil und die unterschiedliche Resistenzprägung in diesen beiden Resistenzquellen unter Freilandbedingungen legen die Vermutung nahe, dass es sich um genetisch verschiedene Resistenzen handeln könnte. Zurzeit laufen Alleliekreuzungen zwischen Bo7212 und Tanjil, um zu prüfen, ob unterschiedliche Resistenz-Genorte in den beiden Resistenzquellen involviert sind. Ergänzend wird angestrebt, durch molekulare Markeranalyse die Zuordnung der Resistenzen zu Kopplungsgruppen zwischen Bo7212 und Tanjil zu vergleichen, um zusätzliche Information zur Identität der beteiligten Resistenzgene zu erhalten.

## Danksagung

Das Projekt wurde aus Mitteln des BMELV-Programmes zur Innovationsförderung (Förderkennzeichen: 28-1-41.028-06) gefördert. Frau Anne Klamroth danken wir für die statistische Auswertung der Freilandresistenzdaten.

## Literatur

- BUDOWLE B, CHAKRABORTY R, GIUSTIAM, EISENBERG AJ, ALLEN RC, 1991: Analysis of VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48, 137-144.
- NELSON MN, PHAN HTT, ELLWOOD SR, MOOLHUIJZEN PM, HANE J, WILLIAMS A, O'LONE CE, FOSU-NYARKO J, SCOBIE M, CAKIR M, JONES MGK, BELLGARD M, KSIŹKIEWICZ M, WOLKO B, BARKER SJ, OLIVER RP, COWLING WA, 2006: The first gene-based map of *Lupinus angustifolius* L. - location of domestication genes and conserved synteny. *Theor Appl Genet* 113, 225-238.
- ROZEN S, SKALETSKY HJ, 2000: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds.), *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology*, 365-386. Humana Press, Totowa, NJ.
- RUGE-WEHLING B, DIETERICH R, THIELE C, EICKMEYER F, WEHLING P, 2009: Resistance to anthracnose in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.): sources of resistance and development of molecular markers. *J Kulturpfl* 61, 62-65.
- UTZ HF, 2005: PLABSTAT. Ein Computerprogramm zur statistischen Analyse von Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik. Universität Hohenheim, Stuttgart.
- YANG H, BOERSMA JG, YOU M, BUIRCHELL BJ, SWEETINGHAM MW, 2004: Development and implementation of a sequence-specific PCR marker linked to a gene conferring resistance to anthracnose disease in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Mol Breed* 14, 145-151.
- YANG HD, RENSCHAW D, THOMAS G, BUIRCHELL B, SWEETINGHAM M, 2008: A strategy to develop molecular markers applicable to a wide range of crosses for marker assisted selection in plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Mol Breed* 21, 473-483.
- YOU M, BOERSMA G J, BUIRCHELL B J, SWEETINGHAM MW, SIDDIQUE KHM, HANG H, 2005: A PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupin breeding. *Cell Mol Biol Lett* 10, 123-134.