

Einsatz molekularer Marker zur Selektion virusresistenter Pflanzen von Wintergerste aus phytopathologischer Sicht

W. HUTH

Zweifellos ist die Resistenz gegenüber Krankheitserregern von der genetischen Konstitution der Pflanzen abhängig. Untersuchungen während der vergangenen 20 Jahre belegen jedoch, dass das Verhalten der Pflanzen auf Infektionen nicht allein auf Genaktivitäten zurückgeführt werden kann. Wesentlich mehr, als bisher aus Mangel entsprechender Untersuchungen heute allgemein bekannt ist, spielt das Pathogen in dem Resistenzverhalten der Pflanzen eine wesentliche Rolle.

Das ist vornehmlich in solchen Pathosystemen mit zwei selbständigen und damit konkurrierenden Organismen, beispielsweise Pflanze und Pilz oder Bakterium. Ein wesentliches Kriterium im Resistenzverhalten der Pflanzen in den meisten Pathosystemen ist aber auch, was zunächst unwahrscheinlich erscheinen mag, der Faktor Umwelt. Den folgenden Überlegungen liegen die erwähnten langjährigen Untersuchungen an Pathosystemen, in die mehrere Viren einbezogen waren, zugrunde. Diese Systeme sind gegenüber pilzlichen Pathosystemen deshalb übersichtlicher, weil an ihnen nur ein selbständiger Organismus, nämlich die Pflanze, beteiligt ist, auf dessen Stoffwechsel die Viren zu ihrer Vermehrung angewiesen sind. Trotzdem können die vorgestellten Ergebnisse auch Hinweise zur Betrachtung der Resistenz gegenüber anderen Pathogenen liefern.

Weil Tests zur Erfassung von Resistenzeigenschaften der Pflanzen unter natürlichen Umweltbedingungen sich meist über einen längeren Zeitraum, wenigstens aber über eine Vegetationsperiode erstrecken, besteht seit längerem das Bestreben Resistenzselektionen durch Anwendung spezieller Verfahren möglichst unter Laborbedingungen zu verkürzen. Eine dieser Methoden war beispielsweise die Bestimmung der Virus-

konzentration in infizierten Pflanzen, welche, abgeleitet aus der traditionellen Resistenzdefinition, nach der sich eine Resistenz in einer Hemmung oder Verzögerung der Pathogenvermehrung ausdrückt. Auch wenn in Einzelfällen eine Korrelation zwischen Virusgehalt und Ertragsleistung, dem eigentlichen für die landwirtschaftliche Praxis relevanten Ausdruck einer Resistenz, nachgewiesen werden kann, belegen zahlreiche Gegenbeispiele, dass der Pathogenanteil in den Pflanzen kein prinzipielles Resistenzkriterium sein kann und seine Verwendung heute nicht mehr zeitgemäß ist und eigentlich nie war.

Ein hoher oder niedriger Virusgehalt bei vergleichbaren Ertragsleistungen ist sowohl eine sortenspezifische wie umweltabhängige Eigenschaft. Da in der Resistenzbetrachtung umweltabhängige Reaktionen der Pflanzen überwiegend bisher keine Beachtung fanden wurde das Resistenzverhalten des Getreides gegenüber BYDV je nach Virusgehalt zwei unterschiedlichen real aber nicht existierenden Formen der Resistenz zugeordnet, nämlich der „Resistenz“ und der „Toleranz“.

Mehr modern sind Verfahren, mit denen anhand des Nachweises spezifischer Stoffwechselprodukte, wie bestimmter Eiweißmoleküle, insbesondere aber molekularer Marker auf dem Pflanzengenom innerhalb der Chromosomen eine Resistenzselektion vorgenommen wird. Breite Anwendung hat dieses Verfahren inzwischen für das Pathosystem Wintergerste und die Gelbmosaikviren *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV, BaYMV-2) und *Barley mild mosaic virus* (BaMMV) gefunden. Die monogene Resistenz der Gerste, „Immunität“ in diesem Fall, gegenüber diesen Viren, welche sich in einer vollständigen Hemmung

der Virusvermehrung äußert, korreliert zu einem hohen Anteil mit dem Nachweis des Resistenzmarkers *ym4* (BaYMV, BaMMV) oder *ym5* (BaYMV, BaYMV-2, BaMMV). Nicht zur Virusvermehrung befähigt, bleiben immune Pflanzen nach einer Virusinokulation virusfrei.

Infizierbar bzw. anfällig und damit nicht immun, oder nicht infizierbar bzw. nicht anfällig und damit immun zu sein ist, nicht nur eine artspezifische, sondern ist auch eine sortenspezifische Eigenschaft: BaYMV/BaMMV werden weder in Pflanzen der Pflanzenarten Weizen oder Hafer noch in Pflanzen einiger Sorten einer Pflanzenart, *Hordeum vulgare*, mit bestimmter genetischer Herkunft vermehrt. Diese Form der Resistenz scheint aber ausschließlich gegenüber den Bymoviren vorzukommen. Obwohl in der Literatur gelegentlich beschrieben, gibt es keine Pflanzen/Sorten, welche als Übergangsformen „mehr oder weniger“ oder vielleicht „partiell anfällig“ sind, wie vielfältig und damit nichtssagend der Begriff auch definiert wird, es sei denn, es handelt sich um inhomogene Sorten. Solchen Zuordnungen liegen falsche Folgerungen aus dem umweltabhängigen Verhalten der Pflanzen zugrunde (z. B. inhomogener Befallsdruck), nicht aber genetische Aspekte.

Wegen der hohen Korrelation sind molekulare Marker wie *ym4* oder *ym5* geeignet, zur Selektion resistenter/immuner Pflanzen verwendet zu werden. Obwohl den Markern bisher keine Funktion, auch keine Genfunktion zugeordnet werden konnte, werden sie gelegentlich - sogar zunehmend - als „Resistenzgene“ beschrieben. Inzwischen mehren sich aber die Hinweise aus der praktischen Pflanzenzüchtung, nach denen *ym4*-Pflanzen von Gelbmosaikviren be-

Autor: Dr. Winfried HUTH, c/o Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit, Messeweg 11/12, D-38104 BRAUNSCHWEIG



fallen werden. Daraus darf jedoch nicht das Vorkommen neuer sog. resistenzbrechender Virusstämme gefolgert werden.

Beruhet die Immunität gegenüber den Gelbmosaikviren auf einem Resistenzgen? Ist eigentlich anzunehmen, dass Pflanzen von Weizen, Hafer und anderen Gräsern, aber auch Buchen, Rosen etc., welche ebenso wie immune Gerstpflanzen nicht zur Vermehrung dieser Viren befähigt sind, Resistenzgene gegen Gelbmosaikviren der Gerste und den vielen anderen Pathogenen, gegenüber denen sie immun sind, besitzen?

Was spricht dagegen die Immunität all dieser anderen Pflanzen der Immunität von Gerste gegenüber BaYMV/BaMMV gleichzusetzen? Es dürfte auch keine Schwierigkeiten bereiten, auch in den Pflanzen dieser und all den anderen Arten, welche nicht anfällig gegenüber den Gerste infizierenden Viren sind, Marker sogar in größerer Zahl zu finden. Ist aber zu erwarten, dass alle diese Pflanzen „Resistenzgene“ gegen all die Pathogene besitzen, gegenüber denen sie nicht anfällig sind?

Diesen Fragen liegt die einfache Überlegung zugrunde, ob für nicht stattfindende Prozesse im Organismus - wie hier die Virusvermehrung - Gene grundsätzlich vorhanden sein müssen oder ob - was logischer erscheint - eine Virusvermehrung deswegen nicht stattfinden kann, weil entsprechende Gene in den immunen Pflanzen fehlen.

Auf der Basis dieser Überlegungen sind Marker lediglich Pflanzenart - spezifische Komponenten, die hochgradig, wenn auch nicht vollständig, wie sich gezeigt hat, mit der monogenen Immunität korrelieren. Diese Vermutung wird durch den Nachweis der verschiedenen anderen Marker, *ym6*, *ym7*, *ym10* etc. untermauert, die alle primär bestimmten Sorten von Wintergerste zugeordnet werden können, welche sich in ihrer Eigenschaft, Nichtwirte der Gelbmosaikviren der Gerste zu sein, gleichen. Jeder dieser Marker hat keine oder wenn ja, dann die gleiche Funktion in Bezug auf die Hemmung der Virusvermehrung. Es ist deshalb fraglich, ob, aus phytopathologischer Sicht sogar nicht zu erwarten, dass eine Kombination (Pyramidisierung) mehrerer solcher Marker

in einer Pflanze oder Sorte die Immunität als höchste Form der Resistenz weiter zu steigern vermag. Es ist auch nicht zu erwarten, dass eine Pyramidisierung zu einer Immunität gegenüber bisher nur hypothetischen Viren führt, deren Eigenschaften völlig unbekannt sind, zumal *ym5*-Pflanzen bereits gegenüber allen gegenwärtig weltweit vorkommenden Herkünften von BaYMV und BaMMV immun sind. Die Vererbbarkeit von Immunität und Markern nach der Mendelschen Gesetzmäßigkeit wird nicht in Frage gestellt, genügt aber nicht als Beweis der Existenz ggf. unterschiedlicher Resistenzgene.

Während die Genetik monogen vererbten Eigenschaften und eine Beziehung zwischen molekularen Markern und der Immunität, übersichtlich erscheint, besteht kein Zweifel daran, dass quantitative, polygen vererbte Eigenschaften schwerer mit Markern zu erfassen sind. Die Vielzahl definierter Marker und entsprechend definierten „Genen“ (s. o.) in Pathosystemen mit pilzlichen Krankheitserregern erscheint mir ein treffendes Beispiel zu sein.

Toleranz ist eine polygen vererbte Form der Resistenz. Laut Definition reagieren tolerante Pflanzen auf den Befall durch Pathogene ohne oder mit nur einer geringen Schädigung. Das bedeutet zunächst, dass anders als bei der Immunität auch tolerante Pflanzen ebenso wie die nicht toleranten Pflanzen vom Pathogen befallen werden können, sie gegenüber dem Pathogen anfällig sind. Das bedeutet weiterhin, wie am Beispiel in der *Abbildung 1* gezeigt wird, dass der Übergang von Toleranz zur Nichttoleranz fließend ist. Wie aber ist eine „geringe“ Schädigung definiert? Ab welchem Grad der Schädigung ist eine Pflanze als tolerant oder nicht tolerant einzustufen?

In der Literatur sind keine Angaben darüber zu finden. Dort wird überwiegend zwischen anfällig oder nicht anfällig (meist als resistent beschrieben; synonym für tolerant!) unterschieden. Wegen des stufenlosen Überganges zur Nichttoleranz kann die Toleranz keine objektiv sondern lediglich subjektiv und damit willkürlich zu definierende Eigenschaft sein. Als tolerant

bezeichne ich jene Sorten, deren Relativertrag (RE; % Ertrag infiz./nicht infiz. Pflanzen einer Sorte/Art) zwischen 100 und 80 liegt. Sorten mit RE zwischen 80 und 50 sind moderat tolerant und jene unter 50 nicht tolerant. Diese Klassifizierung hat sich seit etwa 10 Jahren zur Bestimmung der Toleranzeigenschaften von Pflanzen gegenüber Viren bestens bewährt und ist auch für andere Pathosysteme anwendbar (s. *Abbildung 1*). Toleranz ist die Resistenz infizierbarer und damit anfälliger Pflanzen. Durch die Infektion gestresst reagieren die Pflanzen gegenüber anderen Stressfaktoren, zumeist externe Umwelteinflüsse (z. B. Temperatur), wesentlich empfindlicher als nicht infizierte Pflanzen. Das bedeutet, dass die virusbedingte Minderung der Erträge infolge weiterer Einflussfaktoren weiterhin herabgesetzt wird. Hinzukommt, dass eine Toleranz nur gegenüber dem am schwächsten aggressiven Virus ausgeprägt ist. Es ist besonders bemerkenswert, dass die Toleranz einer Pflanze sogar gegenüber Stämmen/Biotypen verschiedener Viren, z. B. BYDV-PAV, BYDV-MAV, CYMV(-RPV), sofern ihre Aggressivität vergleichbar gering ist, ausgeprägt ist und wie im Falle dieser Luteoviren sie den gleichen Stoffwechsel des Wirtes für ihre Vermehrung beanspruchen. Von jedem dieser Viren existiert eine Vielzahl von Stämmen bzw. Biotypen, die sich in ihrer Aggressivität unterscheiden. Die Toleranz der Pflanzen gegenüber den schwach aggressiven Viren ist geringer gegenüber anderen Stämmen dieser Viren entsprechend deren zunehmenden Aggressivität. Alle Pflanzen aller Sorten von Gerste reagieren abhängig von ihrem Toleranzgrad aber gleichartig gegenüber den „BYD-Viren“ und ihren unterschiedlich aggressiven Stämmen. Nicht nur Pflanzen von Gerste zeigen ein solches gleichartiges Verhalten, sondern auch Pflanzen von anderen Getreidearten, Weizen, Hafer, Roggen und von Gräsern (*Lolium*), ohne dass sortenpflanzenspezifische Abwehrmechanismen gefolgert werden dürften. Weiterhin ist das Verhalten bei Gerste unabhängig vom Besitz des als Resistenzgen bezeichneten Markers „*Yd2*“.

Alle Sorten, ob sie im Besitz dieses Markers sind oder nicht, reagieren in gleicher Weise auf den Befall durch BYDV.

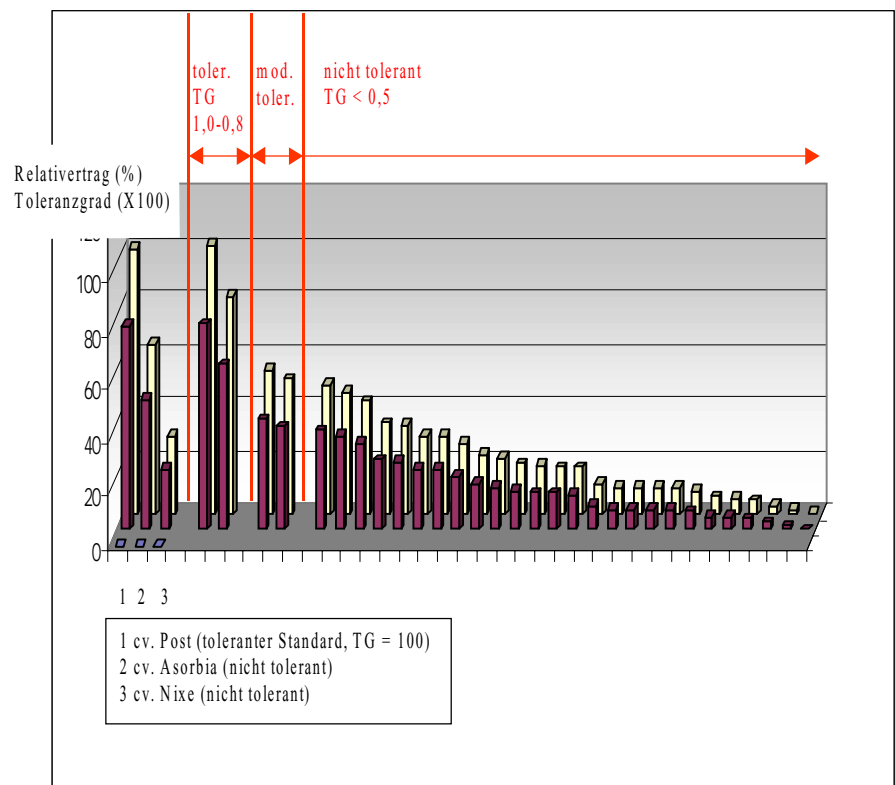
Aus phytopathologischer Sicht hat „Yd2“ deshalb keine unmittelbare Bedeutung für die Resistenzeigenschaft einer Pflanze. Das ist daraus ersichtlich, dass innerhalb der Nachkommen von Kreuzungen, in der wenigstens ein Partner im Besitz des Yd2 ist, maximal nur die Hälfte der toleranten Pflanzen ebenfalls das Yd2 enthielt. Es ist weiterhin bemerkenswert, dass auch ein Teil der Pflanzen, die nicht Yd2-Träger waren, einen höheren Toleranzgrad (Pyramidisierung) aufweisen, als der tolerante Elter. Eine Kombination von Toleranzeigenschaften verschiedener Sorten unterschiedlicher genetischer Herkunft führt anders als bei der Immunität tatsächlich zu einer Pyramidisierung. Andererseits befinden sich innerhalb der Nachkommen von Kreuzungen auch Pflanzen, welche nicht tolerant gegenüber BYDV sind, obwohl in ihnen Yd2 nachgewiesen wurde. Darüber hinaus muss erwähnt werden, dass sich innerhalb von Nachkommen von nicht toleranten Eltern mit Toleranzgraden von unter 0,5 einige Pflanzen mit Toleranzgrade von 0,9 bis 1,0 befanden, also eine Toleranz besitzen, die derjenigen Sorten entspricht, welche heute als tolerante Standardsorten (Post, Vixen, Naturell) verwendet werden (s. *Abbildung 1*).

Für das Pathosystem Gerste und *Barley yellow dwarf* virus wird beispielsweise eine Korrelation von 30% mit der „phänotypischen Varianz“ innerhalb von Kreuzungsnachkommen angegeben. Dieselben Daten zugrundegelegt lässt sich sogar eine Korrelation von 50% errechnen. Das Beispiel verdeutlicht damit, dass die Interpretation der Ergebnisse aus Resistenzversuchen auch sowohl von den experimentellen als auch von mathematisch/statistischen Methoden abhängt und damit ebenso willkürlich ist.

Wenn auch manche vorstehende Betrachtung noch theoretischen Überlegungen entspringt, basiert sie auf Ergebnissen mit neuartigen, standardisierten Resistenztests. Erst dadurch und unter Einbeziehung weiterer die Resistenz be-

einflussender Kriterien wurde es möglich die bisherigen Vorstellungen von der „Resistenz“ kritischer zu betrachten. Das Pathogen, Virus oder Pilz und Bakterium, müssen bei zukünftiger Betrachtung der Resistenz und für eine erfolgreiche Züchtung resistenter Pflanzen wesentlich mehr als bisher berücksichtigt werden. Dazu gehört auch die Erwartungen an eine Resistenz klarer als bisher zu definieren. Die durch die gegenwärtigen Definitionen induzierten Erwartungen an eine resistente Pflanze, nämlich die Resistenz allein als „Nichtanfälligkeit“ zu sehen, kann im Falle der Toleranz nicht erreicht werden. Obwohl seit den 20er Jahren nach Pflanzen gesucht wird, welche gegenüber pilzlichen Krankheitserregern nicht befallen werden, ist es bis heute nicht gelungen eine Sorte zu züch-

ten, die nicht z. B. von Mehltau oder Gelbrost befallen wird. Die Betrachtung der Toleranz (üblicherweise als Resistenz beschrieben) wirft viele Fragen auf. Es bestehen keine Zweifel an genetischen, die Resistenz bewirkenden Prozessen in den Pflanzen, es bestehen aber ernst zu nehmende Zweifel an einer direkten Wirkung von Genen an der Resistenz insbesondere der Toleranz. Eine solche direkte Wirkung von Genen in Resistenzprozessen sich vorzustellen, widerspricht vollends deren Funktion im Stoffwechsel. Kann erwartet werden, dass Gene, „Resistenzgene“, mehr oder weniger und gegenüber unterschiedlich aggressiven Viren unterschiedliche Aktivität besitzen? Daraus ergibt sich auch eine andere Betrachtung in Bezug auf die Nutzung molekularer Marker zur Selektion resistenter Pflanzen.



Daten aus der gemeins. Arbeit SCHEURER, ORDON, FRIEDT (Giessen), HUTH (Braunschweig)

Abbildung 1: Fließender Übergang von Toleranz zu Nichttoleranz; welche Pflanzen sind tolerant welche nicht tolerant? Eine Klassifizierung kann nur willkürlich erfolgen; in welchen Pflanzen sind Toleranzmarker („Toleranzgene“) zu erwarten, in welchen „Anfälligkeitsgene“? Relativerträge (dunkle Säulen, Vordergrund) und Toleranzgrade der Nachkommen von zwei nicht toleranten Eltern (!) nach Infektion mit BYDV-PAV-Bs; innerhalb der Nachkommen befinden sich zwei mit Toleranzgraden (TG = 1,0 und 0,8), die über denen der beiden Eltern (TG = 0,5 und 0,2) lagen (Pyramidisierung von „Toleranzeigenschaften“); Ergebnisse nach 3-jährigen Untersuchungen

