

Tagungsband

59. Tagung

25. - 27. November 2008

ABWEHRSTRATEGIEN GEGEN
BIOTISCHE SCHADERREGER
ZÜCHTUNG VON HACKFRÜCHTEN
UND SONDERKULTUREN

Vereinigung der Pflanzenzüchter
und Saatgutkaufleute Österreichs

59. Tagung

25.-27. November 2008

Abwehrstrategien gegen biotische Schaderreger

Züchtung von Hackfrüchten und Sonderkulturen

Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt
für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein

Impressum

Tagungsband der 59. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs

25.-27. November 2008, Raumberg-Gumpenstein

Herausgeber

Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs
Wiener Straße 64, A-3100 St. Pölten
Tel: (+43)02742/259-9021, Fax: (+43)02742/259-2009
email: office@saatgut-oesterreich.at; www.saatgut-oesterreich.at

Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt
für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein
Direktor Prof. Dr. Albert Sonnleitner

Für den Inhalt verantwortlich

die Autoren

Redaktion

O.Univ.Prof. Dr. Peter Ruckenbauer, Dr. Anton Brandstetter, Manuela Geppner
Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs

a.o.Univ.Prof. Dr. Heinrich Grausgruber
Universität für Bodenkultur Wien

Univ.Do. Dr. Karl Buchgraber
Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein (LFZ)

Layout

Brunhilde Egger
Institut für Pflanzenbau und Kulturlandschaft
Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein (LFZ)

Druck, Verlag und © 2009

Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein
(Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein)
Raumberg 38, A-8952 Irdning
Tel: (+43)03682/22451-0, Fax: (+43)03682/22451-210
email: office@raumberg-gumpenstein.at

ISBN-13:978-3-902559-28-9
ISSN: 2072-9596

Inhaltsverzeichnis

Breeding for Fusarium head blight resistance in wheat - update on the Fusarium research at IFA-Tulln	1
H. Bürstmayr, K. Huber, A. Alimari, B. Steiner, K. Schießl, M. Bürstmayr und M. Lemmens	
Die Genetik der Fusariumresistenz in europäischem Winterweizen	5
J. Häberle, J. Holzapfel und L. Hartl	
Genomforschung an <i>F. graminearum</i>: relevant für zukünftige Bekämpfungsstrategien?	9
G. Adam	
Genetische und molekulare Analyse von drei Pathosystemen bei Weizen und Mais - <i>Fusarium & Septoria</i>	13
T. Miedaner, M. Löffler, P. Risser, P. Schweizer, E. Ebmeyer, V. Korzun, B. Kessel und M. Ouzunova	
Die Bewertung der Ährenfusariosenresistenz bei in der Tschechischen Republik registrierten Winterweizensorten unter verschiedenen Prüfungsmethoden	19
J. Chrpova, M. Váňová und V. Šíp	
Expressionsanalyse der Abwehrreaktion von Winterweizen gegenüber <i>Fusarium graminearum</i>	23
M. Diethelm, S. Mikolajewski, C. Wagner, M. Rhiel, L. Hartl, W. Friedt und G. Schweizer	
Die Entwicklung einer quantitativen PCR Methode zur Beurteilung der <i>Fusarium</i>-Resistenz von Weizen	27
K. Brunner, M.P. Kovalsky Paris, G. Paolino, H. Bürstmayr, M. Lemmens, F. Berthiller, R. Schuhmacher, R. Krska und R.L. Mache	
Planung und Auswertung von Versuchen zur Bewertung der Resistenz von Getreidesortimenten	31
E. Moll	
Entwicklung molekularer Marker für Resistenzgene gegen <i>Oculimacula</i> spp., die Erreger der Halmbruchkrankheit im Weizen (<i>Triticum aestivum</i>)	35
N. Meyer, V. Lind, M. Zahn, W. Friedt und F. Ordon	
Umfassende <i>Rhynchosporium secalis</i> Resistenz bei Gerste - von der Kartierung über die Entwicklung diagnostischer Selektionsmarker zum Pre-Breeding Material	39
K. Hofmann, P. Greif, C. Einfeldt, J. Holzapfel, M. Herz und G. Schweizer	
Improving the yield, processing quality and disease and pest resistance of potatoes by genotypic recurrent selection	43
J.E. Bradshaw	
Introduction to the current results of potato breeding programme at Keszthely	47
Z. Polgar, I. Wolf, I. Cernak and J. Taller	
Kartoffelzüchtung in Österreich	51
F. Fuchs	
Kartoffelzüchtung in der Tschechischen Republik	55
J. Domkářová and J. Bouma	
Late blight resistance breeding with the potato MT progeny	59
B. Trognitz, F. Trognitz, F. Fuchs, T. Grahl, I. Manrique and M. Orrillo	
Interaction between potato and the endophyte <i>Burkholderia phytofirmans</i>	63
F. Trognitz, K. Scherwinski, A. Fekete, S. Schmidt, L. Eberl, J. Rodewald, M. Schmid, S. Compant, A. Hartmann, P. Schmitt- Kopplin, B. Trognitz and A. Sessitsch	
Selektionstechnologie für resistente Kartoffelsorten mit ausgeprägter industrieller Verarbeitungsneigung	67
G. Brader, F. Trognitz, F. Fuchs, A. Weilharter und B. Trognitz	

Polygenic response of potato to late blight following exposure to long-day or short-day by monitoring of gene expression with a cDNA microarray	71
B. Trognitz, F. Trognitz, J. Rodewald and A. Weilharter	
Molecular Breeding Research with Sugar Beet	75
F.J. Kopisch-Obuch ^{1*} , G.G.G. Capistrano, A. Müller, H.-J. Harloff, S.L.M. Frerichmann and C. Jung	
Studies of the tolerance of maize hybrids to corn rootworm in Hungary	77
C.L. Marton, C. Szöke and J. Pinter	
Pyramiding von Resistenzgenen gegen das Zucchini Gelbmosaikvirus in Ölkürbis (<i>Cucurbita pepo</i>)	81
M. Pachner und T. Lelley	
Züchtung eines neuen Körneramaranthgenotyps - Vorgangsweise und Ergebnisse Breeding of a new genotype of grain amaranth - methodology and results	85
G. Dobos und D.M. Gimplinger	
Züchtung von chinesischen Heilpflanzen für den heimischen Anbau	89
H. Heuberger und U. Bomme	
Keimfähigkeit, Triebkraft und Feldaufgang bei Hirse	93
B. Voit, S. Wutz, S. Kunz, A. Roller, E. Sticksel und B. Killermann	
Analyse und Integration wirksamer Mehlauresistenzen in Triticale	97
K. Flath, B. Klocke und M. Herrmann	
Verbesserung der Toleranz der Gerste gegenüber <i>Barley yellow dwarf virus</i> (BYDV) durch Pyramidisierung von QTL	101
C. Riedel, A. Habekuss und F. Ordon	
Einfluss von Genotyp und Umwelt auf den Blatt-Glucosinolatgehalt bei Raps	107
S. Cleemput und H.C. Becker	
Raps als Modell zur Untersuchung der „fixierten Heterosis“ bei allopolyploiden Pflanzen	111
F. Wespel und H.C. Becker	
Einflussfaktoren auf den samenbürtigen Infektionskreislauf bei Streifenkrankheit und Netzfleckenkrankheit der Gerste	115
M. Weinhappel, C. Leonhardt, I. Diethart und W. Hartl	
Enzymatische Löslichkeit von Glutenin als Indikator für die Anfälligkeit gegen Wanzenstich	119
M. Werteker und G. Kramreither	
Virusfreimachung von alten Kartoffelsorten mittels Gewebekulturtechniken unter Einsatz von Ribavirin	121
M. Granilshikova, E. Kopper, M. Schwab und R. Zederbauer	
Survey of winter barley fields for leaf spot diseases: epidemic spread of <i>Ramularia leaf spot</i> in Hungary in 2008	123
K. Manninger, T. Mátrai and I. Muranyi	
Wirkung langjähriger Erhaltungszüchtung auf Anbaueigenschaften, Ertrag und Qualität der Roggensorte EHO-Kurz	125
M. Oberforster, K. Schulmeister und W. Kainz	
Identifizierung von Resistenzgenen in Winterweizen (<i>Triticum aestivum</i>) gegenüber <i>Fusarium graminearum</i>	129
M. Rhiel, M. Diethelm, C. Wagner, G. Schweizer und W. Friedt	
Selektion auf Frosttoleranz von Winterackerbohnen: Methodenoptimierung	131
F. Schrader, R. Martsch und W. Link	
Barley Yellow Dwarf Virus detection and assessment of virus spread in susceptible and resistant barley plants	133
V. Spamer, C. Obermeier and W. Friedt	
Correlation between maize genotypes and the stalk rot caused by maize <i>Fusarium</i>	135
C. Szöke, J. Pintér and C.L. Marton	
Sortenabhängige und zeitliche Entwicklung von Fruchtfäule bei Ölkürbis (<i>C. pepo</i> var. <i>styriaca</i>)	137
J. Winkler, B. Freistetter und H. Huss	

Vorwort

Meine sehr verehrten Damen, sehr geehrte Herren, liebe Tagungsteilnehmer!

Ich darf Sie als Obmann der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs sehr herzlich begrüßen und freue mich, dass Sie so zahlreich an der 59. Pflanzenzüchertagung am Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein teilnehmen. Wir sind sehr froh darüber, dass uns Herr Dr. SONNLEITNER jedes Jahr die Möglichkeit gibt, in diesem idealen Umfeld die Tagung abhalten zu können, obwohl wir eine gewisse Unruhe in den laufenden Schulbetrieb hineinbringen. Herzlichen Dank dafür.

Die Hauptthemen unserer heurigen Veranstaltung betreffen am ersten Tag Fragen der Resistenzzüchtung bei Getreide und beschäftigen sich am folgenden Tag mit der Kartoffelzüchtung und der Züchtung diverser Alternativkulturen. Ich glaube, dass es mit dieser Themenwahl ganz gelungen ist, einen breiten Personenkreis anzusprechen und zur Teilnahme an der Tagung zu bewegen. Ich danke Ihnen für Ihr Kommen, ob Sie nun Vortragender oder Zuhörer sind.

Prof. RUCKENBAUER und Prof. GRAUSGRUBER ist für die Auswahl der aus dem In- und Ausland kommenden Vortragenden zu danken. In diesem Zusammenhang darf ich Sie noch informieren, dass die EUCARPIA ihren ehemaligen Präsidenten RUCKENBAUER (2001-2004) bis zum Jahr 2012 in den Executive Board gewählt hat, was eine ehrende Auszeichnung für sein langjähriges Wirken bedeutet.

Für die bewährte Vorbereitung und Durchführung dieser Tagung danke ich dem Geschäftsführer Dr. BRANDSTETTER und seinem Team sehr herzlich.

Pünktlich zur Züchertagung hat der Winter eingesetzt und wie vorhergesagt, die Landschaft verzaubert. In diesem schönen Umfeld wünsche ich Ihnen einen angenehmen Aufenthalt und eine interessante Veranstaltung, an der Sie nicht nur viel Neues und Interessantes erfahren, sondern auch Gelegenheit und Zeit haben, mit Geschäftspartnern und Freunden manches zu besprechen und zu vereinbaren, was schon immer eine nicht unwesentliche Facette dieser Tagung gewesen ist.

Dr. Herbert ETZ
Obmann

Breeding for Fusarium head blight resistance in wheat - update on the Fusarium research at IFA-Tulln

Hermann Bürstmayr^{1*}, Karin Huber, Abdallah Alimari, Barbara Steiner,
 Katharina Schießl, Maria Bürstmayr und Marc Lemmens

Abstract

During the past decade numerous studies have been published on molecular mapping of Fusarium head blight resistance in wheat: QTL for FHB resistance were found on all wheat chromosomes except chromosome 7D. Some QTL were found in several independent mapping studies indicating that such QTL are stable and therefore useful in breeding programs. We summarize and update current knowledge on the genetics of Fusarium head blight resistance in wheat resulting from published QTL mapping investigations and review and suggest FHB breeding strategies based on the available information and DNA markers. In addition we present current own results on the genetic analysis of novel Fusarium resistance QTL derived from *Triticum macha* a close relative of hexaploid bread wheat, as well as from *T. dicoccum* and *T. dicoccoides* which are relatives of tetraploid durum wheat.

Keywords: Fusarium, resistance, QTL, selection

Introduction

Resistance to Fusarium head blight is of ongoing interest to wheat breeders in many wheat growing regions worldwide, including most parts of Europe (TAYLOR 2004). Practical breeders in many countries have achieved considerable selection progress and farmers can nowadays choose moderately FHB resistant cultivars for wheat production. Despite that, it is still very challenging and resource demanding to develop winter wheat cultivars with an optimal combination of productivity, quality and disease resistance.

During the past years, several review articles have been published on Fusarium diseases of cereals covering different aspects. PARRY et al. (1995) reviewed the significance of the disease with an emphasis on phytopathological aspects.

Reviews of conventional breeding for FHB resistance were published by MIEDANER (1997) and MESTERHAZY et al. (1999). PLACINTA et al. (1999) documented the worldwide occurrence and significance of Fusarium mycotoxins. A comprehensive monograph edited by LEONARD and BUSHNELL (2003) reports in 18 book chapters a range of aspects on Fusarium diseases of small grain cereals, including the pathogen, the associated mycotoxins, resistance breeding and other control options as well as the social and economic impact of the disease. BAI and SHANER (2004) reviewed the management and resistance to FHB in wheat

and barley including the knowledge on FHB resistance QTLs mainly from a North American perspective. HOLZ-APFEL et al. (2008) reported about QTL in winter wheat and neatly summarized own results together with published FHB resistance QTL. The most recent review on FHB resistance in wheat has been provided by BUERSTMAYR et al. (2008). The authors included results of 52 peer-reviewed studies reporting QTL for FHB resistance in wheat.

Of the 52 studies, 46 were done with hexaploid wheat, 4 with tetraploids and 2 with related species. Detailed lists including information on the mapping population, the phenotyping methods and the association of the detected FHB resistance QTL with other traits are illustrated in three tables and one figure. Currently, apart from a few exceptions not much is known on the actual function of FHB resistance genes.

No large effect FHB resistance gene (QTL) has been cloned to date from wheat itself.

Breeding for Fusarium head blight resistance

Basically two roads are available to improve FHB resistance: (1) classical breeding which relies on sexual recombination and selection of naturally occurring resistance alleles in the wheat gene pool; and (2) application of transgenic approaches, known as genetic transformation, in order to introduce novel genes from outside the wheat gene pool. Although a range of promising results on the use of transgenes for resistance improvement have been published already (see for instance LEONARD and BUSHNELL 2003) the following paragraphs in this article will exclusively cover classical plant breeding.

The basic preconditions for successful classical breeding are:

- 1) We need to find genetic variation for the trait of interest in the wheat gene pool(s).
- 2) We need to introduce the resistance trait into the regional breeding material.
- 3) We need selection tools that help us to find the genotypes possessing improved resistance.

1) Genetic variation for FHB resistance

Fortunately, large genetic variation for FHB resistance is available in the primary hexaploid wheat gene pool. Although no immune genotype has been reported to date, lines

¹ University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Department IFA-Tulln, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

* Ansprechpartner: Dr. Hermann BÜRSTMAYR, hermann.buerstmayr@boku.ac.at

with remarkably high levels of FHB resistance have been found in different germplasm pools, like some wheats from Asia, Europe and Latin America (e.g. SNIJDERS 1990). On the other hand, often the best regionally adapted and highly productive cultivars are susceptible to FHB, mainly in cases where selection for FHB resistance has been neglected in the past. Only very limited variation for resistance to FHB has been reported in cultivated durum wheat (*Triticum durum*), therefore its relatives (e.g. *T. dicoccum*, *T. dicocoides*) have been screened in order to find sources for useful resistance genes. Resistance in wild relatives has been studied and is existing and could be used in breeding in the future. However, it is usually a long and tedious process to introduce alien genes into productive cultivars. Even in wild relatives of wheat, so far no immune genotype has been found.

2) Introduction of FHB resistance into regional breeding material

This is the easiest part in the breeding process. If breeders rely on resistance sources available in the primary gene pool, crossing should be easy and straight forward, progeny should be fully fertile. In cases when 'alien genes' are used the development of translocation lines is needed, which needs long term research investments. Whether breeders should rely on so called 'exotic' resistance sources (e.g. Asian spring wheats) or on moderately effective 'native' resistance is subject to ongoing discussions. To my knowledge, so far in Europe no cultivar incorporating 'exotic' Asian spring wheat resistance has been released, but several cultivars have been released with a good level of resistance derived from the native winter wheat germplasm. Obviously, it was easier to select productive cultivars with moderate resistance within the adapted winter wheat gene pool. In case that 'exotic' resistance sources are introduced, breeding populations should be derived from backcrosses of the 'exotic' resistance source with regionally adapted lines instead of single crosses. Several cycles of crossing and selection may be needed in order to regain the desired productivity level.

3) Selection for improved resistance

Most breeders to date relied on phenotypic selection. Phenotypic selection is a very useful approach for selecting improved cultivars. Because Fusarium head blight occurs sporadically in nature in most wheat growing areas, breeders have to apply some tricks. The goal is to determine the level of genetically governed resistance on every line of the analysed population as precisely as possible. One of the main problems in testing for Fusarium resistance is reproducibility (DILL-MACKY 2003). The severity of FHB is a quantitative trait that is modulated by (1) genetic factors of the host (resistance factors in the plant) and of the pathogen (aggressiveness of the fungus) and (2) environmental influence on disease establishment and development leading to significant genotype-by-environment (GxE) interactions. Therefore, in most FHB resistance studies measures are taken to provoke Fusarium infections and apply uniform inoculum pressure over time (flowering period) and space (e.g. experimental field). FHB resistance is a complex trait

and not one single, simple way of measuring FHB resistance is practiced. For a more detailed review on inoculation and evaluation methods see DILL-MACKY (2003). Selection is usually done in specific disease provocation nurseries. The question when in the breeding process FHB resistance screening should be started depends on the regional preferences and the relative importance of the trait. If FHB resistance is considered a key trait for a new cultivar in a certain area, selection should start as early as possible, for instance already in F3 head rows. If selection is practised over several subsequent generations, the selected population will shift significantly in its average resistance performance.

Although phenotypic selection is a very useful and successful approach, it is not simple and it is time consuming. Therefore, alternative selection procedures may be considered. Unfortunately, neither seedling tests nor *in-vitro* screening methods for FHB resistance have been established or validated to date.

However, in recent years numerous projects on molecular mapping of FHB resistance in wheat have been performed in many labs around the globe (see BUERSTMAYR et al. 2008) opening the way for molecular marker assisted selection. In this case selection is practised based on genetic fingerprints typical for resistance genes (QTL). In the ideal case perfect markers, which predict presence or absence of the desired allele at a resistance locus are preferable, but these are not available for most of the known FHB resistance QTL apart from *Fhb1* (syn. *Qfhs.ndsu-3BS*) mapping to chromosome 3BS (LIU et al. 2008). In all other cases breeders have to rely on linked markers around the resistance locus. However, even linked markers, in most cases SSR (microsatellite) markers, which show a distinct haplotype for the resistance allele at the QTL, have been applied successfully in the selection process. The relative advantage of molecular marker assisted selection is that selection can be started very early in the selection process (BC_1 or F_2) and that desired QTL can be moved skilfully from exotic germplasm into well adapted lines in relatively short time. In several case studies marker assisted selection proved to be efficient. For instance WILDE et al. (2007) showed that both phenotypic selection and marker based selection led to significant gain by selection, gain per unit time was larger in marker based selection. On the other hand, marker based selection can only utilize the mapped, large effect QTL and not quantitative minor QTL, which are usually missed in QTL mapping. The possibly best approach would be to skilfully combine marker selection with phenotypic selection: one could select in early generations of the breeding programs for presence of a few large effect QTL but keep the breeding populations large enough in order to allow further improvement by phenotypic selection in later generations.

Own results with 16 winter wheat backcross-two derived families differing in two major QTL from spring wheat indicated that on average over 6 experiments, presence of *Qfhs.ifa-5A* led to a reduction in FHB severity compared to the respective sister lines with no QTL of 16%, presence of *Fhb1* reduced disease severity by 29% and both QTL

combined by 35%. Yield tests with a subset of these sister lines gave no clear trend indicating that no yield penalty was associated with these QTL *per se*.

Special emphasis has been given in the past few years to the association of FHB resistance with plant height. Generally, a negative association between plant height and FHB susceptibility has been reported numerous times, i.e. short lines tend to be more susceptible than tall lines. It has been suggested that tall plants are possibly exposed to less FHB inoculum and a lower infection pressure compared to tall plants. Recently, several reports showed that the semi-dwarfing allele *RhtD1b* is strongly associated with increased FHB susceptibility, but not with plant height *per se* (DRAEGER et al. 2007, HOLZAPFEL et al. 2008). Whether or not the *RhtD1b* allele is causally involved in reduced resistance or linked to a susceptibility allele nearby needs further investigations. Possibly other known dwarfing genes are also associated with susceptibility, like *RhtB1b* and *Rht8* (HANDA et al. 2008), but further research is needed to clarify this relation. Another interesting subject is the association between FHB resistance and wheat flowering, especially anther extrusion. There is substantial evidence that wheat lines with rapid and efficient anther extrusion exhibit lower FHB susceptibility (TAYLOR 2004, SKINNES et al. 2008).

Current ongoing research projects at the IFA-Tulln lab

After a few successful QTL mapping studies using spring wheat sources in the past (BUERSTMAYR et al. 2002, 2003, STEINER et al. 2004, LEMMENS et al. 2005), we focused recently on more distant resistance sources like hexaploid *Triticum macha* (Georgian spelt wheat) and tetraploid *T. dicoccum* (cultivated emmer) and *T. dicoccoides* (wild emmer). Especially the tetraploid resistance sources appear promising, because there is an urgent need to increase FHB resistance in durum wheat and introduction resistance from bread wheat in durum wheat was only partly successful so far.

QTL in *T. macha* were found on chromosomes 2A, 2B, 5A and 5B. Notably, the relatively largest QTL mapped at the Q-locus of chromosome 5A. In the *T. dicoccoides* accession 'Mt. Gerizim-52' from Israel QTL were found on chromosomes 3A and 6B. Two populations of BC1F5 derived lines from the *T. dicoccum* (cultivated emmer) 'line 161' crossed with either Helidur and Floradur were evaluated over three years. There was surprisingly little agreement in the QTL detected in these populations. While in the *T. dicoccum* x Floradur population the largest QTL mapped to chromosomes 3B and 6B in the *T. dicoccum* x Helidur population the largest effect was associated with the *RhtB1* locus and susceptibility was associated with the semi dwarf allele (*RhtB1b*). The detailed results from these ongoing mapping projects will be published in the coming year.

In addition, we intensively work on research projects to gain further insight into the genes and pathways that are involved on FHB resistance of wheat by applying functional genomics approaches. For further details see STEINER et al. (2008).

Acknowledgments

The presented work is based on several grant funded projects, primarily the Austrian Science Fund (FWF) projects 'AB-QTL mapping of Fusarium resistance' (P17310), and 'Identification and characterization of expressed genes involved in Fusarium head blight resistance of wheat' (P16724), and the Euro Trans Bio project 'Short Wheat', with support from the breeding company Saatzucht-Donau, Austria. The research work of IFA-Tulln is supported by the Government of Lower Austria.

References

- BAI, G.H. and G. SHANER, 2004: Management and resistance in wheat and barley to Fusarium head blight. *Ann. Rev. Phytopathol.* 42, 135-161.
- BUERSTMAYR, H., M. LEMMENS, L. HARTL, L. DOLDI, B. STEINER, M. STIERSCHNEIDER and P. RUCKENBAUER, 2002: Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (type II resistance). *Theor. Appl. Genet.* 104, 84-91.
- BUERSTMAYR, H., B. STEINER, L. HARTL, M. GRIESSER, N. ANGERER, D. LENGAUER, T. MIEDANER, B. SCHNEIDER and M. LEMMENS, 2003: Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theor. Appl. Genet.* 107, 503-508.
- BUERSTMAYR, H., T. BAN and J.A. ANDERSON, 2009: QTL mapping and marker assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat - a review. *Plant Breeding*, 128, 1-26.
- DILL-MACKY, R., 2003: Inoculation methods and evaluation of Fusarium head blight resistance in wheat. In: K. J. Leonard, and W. R. Bushnell (eds.) *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*, 184-210. The American Phytopathological Society, St. Paul.
- DRAEGER, R., N. GOSMAN, A. STEED, E. CHANDLER, M. THOMSETT, SRINIVASACHARY, J. SCHONDELMAIER, H. BUERSTMAYR, M. LEMMENS, M. SCHMOLKE, A. MESTERHAZY and P. NICHOLSON, 2007: Identification of QTLs for resistance to Fusarium head blight, DON accumulation and associated traits in the winter wheat variety Arina. *Theor. Appl. Genet.* 115, 617-625.
- HANDA, H., N. NAMIKI, D.H. XU and T. BAN, 2008: Dissecting of the FHB resistance QTL on the short arm of wheat chromosome 2D using a comparative genomic approach: from QTL to candidate gene. *Mol. Breed.* 22, 71-84.
- HOLZAPFEL, J., H.H. VOSS, T. MIEDANER, V. KORZUN, J. HÄBERLE, G. SCHWEIZER, V. MOHLER, G. ZIMMERMANN and L. HARTL, 2008: Inheritance of resistance to Fusarium head blight in three European winter wheat populations. *Theor. Appl. Genet.* 117, 1119-1128.
- LEONARD, K.J. and W.R. BUSHNELL, 2003: *Fusarium head blight of wheat and barley* American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul, USA.
- LEMMENS, M., U. SCHOLZ, F. BERTHILLER, C. DALL'ASTA, A. KOUTNIK, R. SCHUHMACHER, G. ADAM, H. BUERSTMAYR, A. MESTERHAZY, R. KRŠKA and P. RUCKENBAUER, 2005: The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for Fusarium head blight resistance in wheat. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 18, 1318-1324.
- LIU, S., M.O. PUMPHREY, B.S. GILL, H.N. TRICK, J.X. ZHANG, J. DOLEZEL, B. CHALOUB and J.A. ANDERSON, 2008: Towards positional cloning of *Fhb1*, a major QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. *Cereal Res. Comm.* 36, Suppl. B, 195-201.

- MESTERHAZY, A., T. BARTOK, C.G. MIROCHA and R. KOMOROCZY, 1999: Nature of wheat resistance to Fusarium head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding* 118, 97-110.
- MIEDANER, T., 1997: Breeding wheat and rye for resistance to Fusarium diseases. *Plant Breeding* 116, 201-220.
- PARRY, D.W., P. JENKINSON and L. MCLEOD, 1995: Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathol.* 44, 207-238.
- PLACINTA, C.M., J.P.F. D'MELLO and A.M.C. MACDONALD, 1999: A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Animal Feed Sci. Technol.* 78, 21-37.
- VAN EGMOND, H.P., 2004: Natural toxins: risks, regulations and the analytical situation in Europe. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1152-1160.
- SNIJDERS, C.H.A., 1990: Genetic variation for resistance to Fusarium head blight in bread wheat. *Euphytica* 50: 171-179.
- SKINNES H., Y. TARKEGNE, J.A. DIESETH and A. BJORNSTAD, 2008: Associations between antehr extrusion and Fusarium head blight in European wheat. *Cereals Res. Comm* 36, Suppl. B, 223-231.
- STEINER, B., M. LEMMENS, M. GRIESSER, U. SCHOLZ, J. SCHONDELMAIER and H. BUERSTMAYR, 2004: Molecular mapping of resistance to Fusarium head blight in the spring wheat cultivar Frontana. *Theor. Appl. Genet.* 109, 215-224.
- STEINER B., H. KURZ, M. LEMMENS and H. BUERSTMAYR, 2009: Differential gene expression of related wheat lines with contrasting levels of head blight resistance after *Fusarium graminearum* inoculation. *Theor. Appl. Genet.* 118, 753-764.
- TAYLOR, M., 2004: Incorporation of Fusarium head blight resistance into European winter wheat breeding programs. In: Canty, S.M., Boring, T., Wardwell, J. and Ward, R.W (Eds.), *Proceedings of the 2nd International Symposium on Fusarium Head Blight; incorporating the 8th European Fusarium Seminar*, 11-15 December, Orlando, FL, USA. Michigan State University, East Lansing, MI., 195-196.
- WILDE, F., V. KORZUN, E. EBMEYER, H.H. GEIGER and T. MIEDANER, 2007: Comparison of phenotypic and marker-based selection for Fusarium head blight resistance and DON content in spring wheat. *Mol. Breed.* 19, 357-370.

Die Genetik der Fusariumresistenz in europäischem Winterweizen

Jennifer Häberle¹, Josef Holzapfel¹ und Lorenz Hartl^{1*}

Abstract

The analysis of four mapping populations segregating at the *Rht-D1* locus together with previous studies in UK winter wheat revealed that the semi-dwarfing allele *Rht-D1b* seems to be the major source for FHB susceptibility in European winter wheat. Beside this major QTL at the *Rht-D1* locus, FHB resistance in winter wheat is based on a higher number of QTL (4-10) with small to moderate effects depending on the genetic background and environment.

A comparison considering already published results from European winter wheat resulted in 27 regions repeatedly associated with FHB resistance. This indicates that FHB resistance is inherited in a complex manner by partially similar genes with varying effects and that even QTL with smaller effects can be identified reliably. In addition to *Rht-D1*, further important QTL (*Qfhs.lfl-1BL*, *Qfhs.lfl-6AL*, *Qfhs.lfl-7BS*) were identified mapping to clusters of loci involved in FHB resistance. The verification of these QTL in a more homogeneous genetic background revealed a relative reduction of FHB severity between 27% and 42%. Furthermore, their importance for a good FHB resistance level is highlighted by the fact that the most resistant genotypes carried at least one of the mentioned resistance alleles.

Keywords: Fusarium head blight, QTL, resistance, *Triticum aestivum*, wheat

Einleitung

Die durch Fusarium-Pilze hervorgerufene partielle Tau-bährigkeit bei Weizen stellt weltweit ein Problem dar. Die Züchtung und der Anbau resistenter Sorten ist die vielversprechendste Strategie zur Kontrolle von Ährenfusariosen. Die Resistenz gegenüber Ährenfusariosen ist allerdings ein genetisch komplexes und polygen vererbtes Merkmal. Aufgrund der limitierten genetischen Diversität im europäischen Genpool wird angenommen, dass die Fusariumresistenz zumindest teilweise auf denselben Resistenzloci beruht.

Mittels molekularer Markeranalyse kann eine Aussage über die Resistenzen unterschiedlicher Genotypen gemacht werden. Ziele der vorliegenden Studie waren (1) die Positionen von Resistenz-QTL verschiedener Winterweizensorten untereinander und mit bisher publizierten Studien zu vergleichen (2) den Einfluss des Kurzstrogens *Rht-D1b* auf den Befall mit Ährenfusariosen in vier Kartierungspopulationen zu ermitteln und (3) die Effekte ausgewählter Resistenz-QTL in einem homogeneren genetischen Hintergrund zu überprüfen.

Material und Methoden

Für die Erstellung der vier Kartierungspopulationen wurden jeweils die resistenten Sorten Apache, History, Romanus und Solitär (alle Träger des *Rht-D1a*-Allels) mit den anfälligen halbverzweigten (*Rht-D1b*-Allel) Sorten Biscay, Rubens, Pirat und Travix gekreuzt. Die Populationen bestanden jeweils aus 103-216 RILs und wurden in den Jahren 2005 und 2006 an vier bis fünf Standorten nach Sprühhinokulation mit *F. culmorum* evaluiert. Die Erfassung der phänotypischen Daten, die Genotypisierung sowie die QTL-Analyse für die Merkmale Fusariumbefall, Wuchshöhe und den Zeitpunkt des Ährenschiebens wurden bereits von VOSS et al. (2008) und HOLZAPFEL et al. (2008a und 2008b) beschrieben. Im Falle einer eindeutigen Überlappung der ermittelten 95%-igen Vertrauensintervalle wurde von einer Übereinstimmung der QTL ausgegangen. Zusätzlich wurden alle publizierten QTL für den Vergleich mit einbezogen, deren wahrscheinlichste Position (ermittelt anhand des angegebenen Markerintervalls bzw. der LOD-Kurve) mit den QTL-Konfidenzintervallen in den hier untersuchten Populationen überlappte. Dabei wurden QTL für folgende Merkmale, die mit der Fusariumresistenz in Verbindung stehen, aus den publizierten Studien berücksichtigt: Typ I Eindringungsresistenz, Typ II Ausbreitungsresistenz, kombinierte Typ I+II Resistenz, DON-Resistenz, relatives Ährchengewicht von infizierten gegenüber Kontrollähren, Gehalt an pilzlicher DNA und Blütenöffnungswinkel.

Um die in der Dream/Lynx-Kartierungspopulationen detektierten Resistenz-QTL auf den Chromosomen 6AL und 7BS (SCHMOLKE et al. 2005) zu validieren, wurden Linien mit einem relativ homogenen genetischen Hintergrund mittels Rückkreuzungs- und Selbstungsgenerationen markergestützt entwickelt (HÄBERLE et al. 2007). Resistenzdonoren waren dabei zwei resistente F4-Linien aus der Kartierungspopulation, die mit dem anfälligen Elter Lynx gekreuzt wurden, gefolgt von zwei weiteren Rückkreuzungsgenerationen sowie zwei nachfolgenden Selbstungsgenerationen. Die selektierten Linien, die 2005 an drei Standorten im Feld geprüft wurden, befanden sich in der BC₂S_{2,3}-Generation.

Um den phänotypischen Effekt des von Cansas stammenden Resistenz-QTL *Qfhs.lfl-1BL* in einem homogeneren genetischen Hintergrund abschätzen zu können, wurden Nachkommen von vier F_{4,7}-Linien der ursprünglichen Cansas/Ritmo-Kartierungspopulation (KLAHR et al. 2007) selektiert und vermehrt, die bezüglich dieses Haupt-QTL noch spalteten. Insgesamt wurden 2007 und 2008 90 ausgewählte Linien in 4 Umwelten nach Sprühhinokulation mit *F. culmorum* geprüft. Eine QTL Meta-Analyse für die

¹ Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 8, D-85354 FREISING

* Ansprechpartner: Dr. Lorenz HARTL, lorenz.hartl@lfl.bayern.de

integrierte Karte von Chromosom 1BL wurde mit dem Programm BioMERCATOR Version 2.1 durchgeführt (ARCADE et al. 2004).

Alle Feldversuche waren als Gitteranlage angelegt, deren Auswertung mit Plabstat Version 2P (Utz 2001) erfolgte. Weitere statistische Analysen wurden mit SAS Version 9.1 (SAS Institut Inc. 2004) durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

In der Apache/Biscay-Population konnten insgesamt 13 signifikante ($P < 0,001$) Resistenz-QTL gegen Ährenfusarium identifiziert werden, in der History/Rubens-Population 8, in der Romanus/Pirat-Population 14 und in der Solitär/Travix-Population 18 (HOLZAPFEL et al. 2008a und 2008b). Der QTL mit dem größten Effekt wurde in allen vier Populationen beim *Rht-D1*-Locus gefunden. Die Donoren des QTL waren dabei jeweils die Träger des Wildtypallels *Rht-D1a* (Apache, History, Romanus, Solitär). Der QTL führte je nach Population zu einer relativen Befallsreduktion zwischen 14,2% und 31,5% bei gleichzeitiger Verlängerung der Halmlänge um 5,7-17,1 cm. Der negative Effekt des Kurzstrohgens *Rht-D1b* auf die Fusariumresistenz wurde auch schon in anderen Winterweizenpopulationen beobachtet (DRAEGER et al. 2007, SRINIVASACHARY et al. 2008). Auch in den Populationen Dream (*Rht-D1a*)/Lynx (*Rht-D1b*), G16-92 (*Rht-D1a*)/Hussar (*Rht-D1b*) und Cansas (*Rht-D1a*)/Ritmo (*Rht-D1b*) konnte jeweils ein Haupt-QTL am *Rht-D1*-Locus identifiziert werden. Der negative Effekt von *Rht-D1b* auf die Fusariumresistenz könnte auf der gleichzeitigen Vererbung eng gekoppelter „schädlicher“ Gene beruhen oder auf Pleiotropie. Das Protein, das von *Rht-D1* codiert wird, ist ein Ortholog von GAI (Gibberellin Acid Insensitive) aus *A. thaliana* mit einer sogenannten

DELLA-Domäne (HEDDEN 2003). Aufgrund der Eigenschaften dieses Proteins scheinen pleiotrope Effekte von *Rht-D1b* auf die Fusariumresistenz wahrscheinlich.

Der Vergleich von QTL-Positionen der vier Winterweizenpopulationen sowohl untereinander als auch mit bisher publizierten Studien ergab neben der *Rht-D1*-Region 26 weitere Genomregionen, die wiederholt mit Fusariumresistenz assoziiert wurden. Bezieht man in die Vergleiche auch Studien aus dem Sommerweizen mit ein konnten sogar 32 „QTL-Cluster“ identifiziert werden. Trotz variierender QTL-Effekte in verschiedenen Umwelten bzw. Populationen konnte für eine Vielzahl von QTL Übereinstimmungen gefunden werden. Dies zeigt, dass die Fusariumresistenz zwar sehr komplex, aber oft durch gleiche Genomregionen mit variierenden Effekten vererbt wird und dass selbst QTL mit kleineren Effekten zuverlässig detektiert werden können.

Das Konfidenzintervall des Haupt-QTL (jetzt *Qfhs.lfl-1BL*) aus der Cansas/Ritmo-Population (KLAHR et al. 2007) überlappte mit QTL, die auch in den Populationen Apache/Biscay, History/Rubens und Romanus/Pirat identifiziert werden konnten und dort je nach Population und Umwelt zwischen 1% und 14% der phänotypischen Varianz erklärten (HOLZAPFEL et al. 2008a). Der Effekt des QTL kam dabei je nach Kreuzung vom resistenten (Cansas, History) oder vom anfälligen (Biscay, Pirat) Elter. Der AFLP-Markerlocus *XP6451-190* kartierte in allen vier genannten Populationen auf den langen Arm von Chromosom 1BL und lag dabei immer innerhalb des QTL-Vertrauensintervalls. Er zeichnete sich außerdem durch eine gleichbleibende Phase aus: bei Genotypen mit Resistenzallel fehlte das entsprechende Markerfragment. Eine nachfolgende Meta-Analyse mit der integrierten Karte von Chromosom 1BL bestätigte, dass es sich bei dem in den Sorten Biscay, Cansas, History und Pirat identifizierten QTL tatsächlich um denselben QTL handelte.

In den zur QTL-Verifikation erstellten Linien mit homogenerem genetischem Hintergrund führte das Resistenzallel des QTL *Qfhs.lfl-1BL* sogar zu einer relativen Befallsreduktion von 42% im Vergleich zur anfälligen Markerklasse ohne Resistenzallel (Abbildung 1). Dabei hatte der QTL keinen Effekt auf die Wuchshöhe, jedoch verzögerte er den Zeitpunkt des Ährenschiebens signifikant ($P < 0,05$) um einen Tag. Dass es sich hierbei um einen wichtigen Genort für die Fusariumresistenz handelt, zeigte sich auch dadurch, dass alle Linien mit geringem Befallsniveau den QTL aufwiesen (Abbildung 1). Ohne diesen QTL erreichte keine Linie einen Befall unter 15%.

Weitere interessante Genombereiche, die wiederholt mit der Fusariumresistenz assoziiert waren, befanden sich auf den Chromosomen 6AL und 7BS. Auf Chromosom 6AL konnten in den Populationen Dream/Lynx (SCHMOLKE et al. 2005), Apache/Biscay (HOLZAPFEL et al. 2008a), Spark/Rialto (SRINIVASACHARY et al. 2008) und ND2603/Butte86 (ANDERSON et al. 2001) überlappende QTL gefunden werden. In dem QTL-Cluster auf Chromosom 7BS überlappten QTL, die von Dream (SCHMOLKE et al. 2005) und Cansas (KLAHR et al. 2007) sowie den beiden asiatischen Sommerweizen Wangshuibai (JIA et al. 2005) und Ning7840 (GUPTA et al. 2000) stammten.

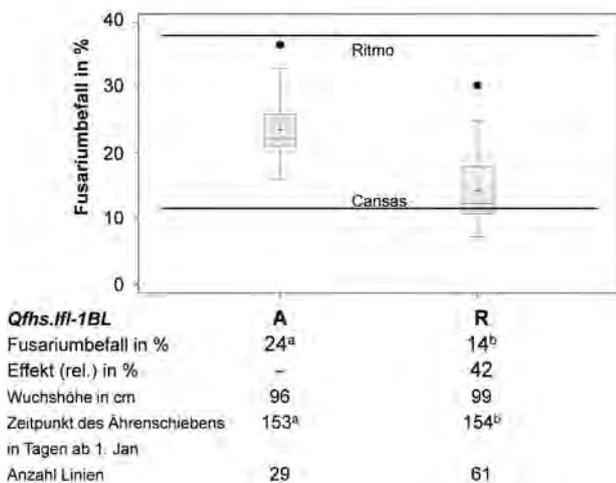


Abbildung 1: Boxplot-Verteilung der für die QTL-Verifikation selektierten 90 Genotypen nach Sprühinokulation mit *F. culmorum* - aufgeteilt nach den beiden Markerklassen mit dem anfälligen (A) bzw. resistenten (R) Allel von *Qfhs.lfl-1BL*. Die 90 Genotypen gehen zurück auf vier bezüglich *Qfhs.lfl-1BL* heterozygote $F_{4:7}$ -Linien der ursprünglichen Cansas/Ritmo-Kartierungspopulation (KLAHR et al. 2007). Die Daten basieren auf den Mittelwerten über vier Umwelten der Jahre 2007 und 2008. Durchgezogene Linie: Median, +: Mittelwerte. Verschiedene Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede nach einem Scheffé-Test hin ($P < 0,05$).

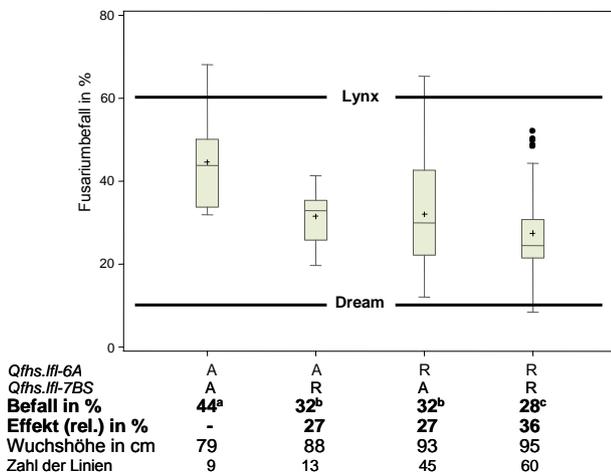


Abbildung 2: Boxplot-Verteilungen der für die QTL-Verifikation erstellten BC₂S_{2,3}-Linien (Dream/Lynx*4) nach Sprühinokulation mit *F. culmorum* - aufgeteilt nach den vier Markerklassen mit den anfälligen (A) und/oder den resistenten (R) Allelen der QTL *Qfhs.lfl-6AL* und *Qfhs.lfl-7BS*. Die Daten basieren auf den Mittelwerten über drei Umwelten 2005. Durchgezogene Linien: Median, +: Mittelwerte. Verschiedene Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede nach einem Scheffé-Test hin ($P < 0,05$).

Die QTL-Validierung bestätigte die signifikanten Effekte der beiden von Dream kommenden Haupt-QTL auf den Chromosomen 6AL und 7BS in BC₂S_{2,3}-Rückkreuzungslinien (Dream/Lynx*4) (HÄBERLE et al. 2007). *Qfhs.lfl-6AL* und *Qfhs.lfl-7BS* führten jeweils zu einer relativen Befallsreduktion von 27% im Vergleich zur anfälligen Markerklasse ohne Resistenzallele, beide QTL in Kombination reduzierten den relativen Befall um 36% (Abbildung 2). Beide QTL hatten außerdem einen Einfluss auf die Wuchshöhe. Dabei führte *Qfhs.lfl-6AL* zu durchschnittlich 14 cm höheren Pflanzen, während *Qfhs.lfl-7BS* die Wuchshöhe um durchschnittlich 9 cm vergrößerte.

Genotypen, die beide Resistenzallele kombiniert aufwiesen, waren im Vergleich zur anfälligen Markerklasse um durchschnittlich 16 cm höher. Bezüglich dem Zeitpunkt des Ährenschiebens konnte kein Unterschied zwischen den vier Markerklassen gefunden werden. Die Ergebnisse der QTL-Validierung im rekurrenten Elter bestätigten die Kartierung der Haupt-QTL von SCHMOLKE et al. (2005), wobei die Effekte der genannten QTL in den Rückkreuzungslinien in etwa den additiven Effekten dieser QTL in der Kartierungspopulation entsprachen.

Dass die beiden QTL entscheidend für ein gutes Resistenzniveau sind, verdeutlicht auch die Tatsache, dass der Großteil der Rückkreuzungslinien mit mindestens einem der beiden QTL eine deutlich niedrigere Anfälligkeit als der Elter Lynx zeigt, obwohl mit diesem bei der Entwicklung der Linien für die QTL-Validierung drei mal gekreuzt wurde.

Literatur

ANDERSON, J.A., R.W. STACK, S. LIU, B.L. WALDRON, A.D. FJELD, C. COYNE, B. MORENO-SEVILLA, J.M. FETCH, Q.J. SONG, P.B. CREGAN and R.C. FROHBERG, 2001: DNA markers for Fusarium

head blight resistance QTLs in two wheat populations. *Theor Appl Genet* 102:1164-1168.

- ARCADE, A., A. LABOURDETTE, M. FALQUE, B. MANGIN, F. CHARDON, A. CHARCOSSET and J. JOETS, 2004: BioMercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. *Bioinformatics* 20:2324-2326.
- DRAEGER, R., N. GOSMAN, A. STEED, E. CHANDLER, M. THOMSETT, SRINIVASACHARY, J. SCHONDELMAIER, H. BUERSTMAYR, M. LEMMENS, M. SCHMOLKE, A. MESTERHAZY and P. NICHOLSON, 2007: Identification of QTLs for resistance to Fusarium head blight, DON accumulation and associated traits in the winter wheat variety Arina. *Theor Appl Genet* 115:617-625.
- GUPTA, A.E., P.E. LIPPS and K.G. CAMPBELL, 2000: Finding quantitative trait locus associated with Fusarium head blight of wheat using simple sequence repeat markers. *Proceedings of the 2000 National Fusarium Head Blight Forum*, Erlanger:28-32.
- HÄBERLE, J., M. SCHMOLKE, G. SCHWEIZER, V. KORZUN, E. EBMAYER, G. ZIMMERMANN and L. HARTL, 2007: Effects of two major Fusarium head blight resistance QTL verified in a winter wheat backcross population. *Crop Sci* 47:1823-1831.
- HEDDEN, P., 2003: The genes of the Green Revolution. *Trends Genet* 19:5-9.
- HOLZAPFEL, J., H.-H. VOSS, T. MIEDANER, V. KORZUN, J. HÄBERLE, G. SCHWEIZER, V. MOHLER, G. ZIMMERMANN and L. HARTL, 2008a: Inheritance of resistance to Fusarium head blight in three European winter wheat populations. *Theor Appl Genet* 117, 1119-1128.
- HOLZAPFEL, J., V. MOHLER, J. HÄBERLE, G. SCHWEIZER, T. MIEDANER, H.-H. VOSS, V. KORZUN and L. HARTL, 2008b: Genome distribution of QTL for Fusarium head blight resistance in European wheat germplasm. The 11th International Wheat Genetics Symposium proceedings in Brisbane, Qld, Australia, 24-29 August, P140.
- JIA, G., P. CHEN, G. QIN, G. BAI, X. WANG, S. WANG, B. ZHOU, S. ZHANG and D. LIU, 2005: QTLs for Fusarium head blight response in a wheat DH population of Wangshuibai/Alondra's'. *Euphytica* 146:183-191.
- KLAHR, A., G. ZIMMERMANN, G. WENZEL and V. MOHLER, 2007: Effects of environment, disease progress, plant height and heading date on the detection of QTLs for resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat cross. *Euphytica* 154:17-28.
- SAS Institute Inc. (2004) SAS OnlineDoc® 9.1.2. SAS Institute Inc., Cary.
- SCHMOLKE, M., G. ZIMMERMANN, H. BUERSTMAYR, G. SCHWEIZER, T. MIEDANER, V. KORZUN, E. EBMAYER and L. HARTL, 2005: Molecular mapping of Fusarium head blight resistance in the winter wheat population Dream/Lynx. *Theor Appl Genet* 111:747-756.
- SRINIVASACHARY, N. GOSMAN, A. STEED, J. SIMMONDS, M. LEVERINGTON-WAITE, Y. WANG, J. SNAPE and P. NICHOLSON, 2008: Susceptibility to Fusarium head blight is associated with the *Rht-D1b* semi-dwarfing allele in wheat. *Theor Appl Genet* 116:1145-1153.
- UTZ, H.F., 2001: PLABSTAT: a computer programm for statistical analysis of plant breeding experiments. Version 2P. Institute of Plant Breeding, Seed Science and Population Genetics, University of Hohenheim, Germany.
- VOSS, H.-H., J. HOLZAPFEL, L. HARTL, V. KORZUN, F. RABENSTEIN, E. EBMAYER, H. COESTER, H. KEMPF and T. MIEDANER, 2008: Effect of the *Rht-D1* dwarfing locus on Fusarium head blight rating in three segregating populations of winter wheat. *Plant Breed* 127:333-339.

Danksagung

Für die Unterstützung und die Betreuung von Versuchsfeldern möchten wir der DSV (Deutsche Saatveredelung), der KWS Lochow GmbH, der Landessaatzuchtanstalt der Universität Hohenheim, R.A.G.T., der Saatzucht Breun, Saatzucht Schweiger sowie der W.v. Borries-Eckendorf GmbH danken. Für die ausgezeichnete technische Assistenz möchten wir uns insbesondere bei P. GREIM, L. LOGOTHETIS, E. MADGE und S. SCHMIDT bedanken sowie

bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Genomanalyse und Weizen. Die Projekte wurden vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und dem EUREKA Konsortium (Projekt Nr. 2386), dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz und der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e. V. (GFP) (Projekt Nr. 04HS015), sowie dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des GABI-Kanada-Projekts (Subprojekt C Nr. 0313711C) gefördert.

Genomforschung an *F. graminearum*: relevant für zukünftige Bekämpfungsstrategien?

Gerhard Adam^{1*}

Zusammenfassung

Die Kontrolle des pathogenen Pilzes *Fusarium graminearum*, des Erregers der Ährenfusariose von Getreide und der Kolbenfäule von Mais und Krankheiten ist schwierig. Der Pilz hat ein enorm breites Wirtsspektrum, und es sind keine vollständigen Resistenzen im Zuchtmaterial bekannt. Fungizidbehandlung und Biokontrolle sind ineffizient, und gegenwärtige Trends im Pflanzenbau (nichtwendender Bodenbearbeitung) dürften den Befallsdruck in Zukunft noch erhöhen. Eine Hoffnung ist, dass Genomforschung an *Fusarium* zu einem verbesserten Verständnis der Virulenzmechanismen dieses Pilzes führen wird. Aufgrund der erstaunlichen Zahl an vorhergesagten Genen mit einer Rolle in der Biosynthese von (derzeit weitgehend unbekanntem) Sekundärmetaboliten im *Fusarium*-Genom, ist unsere Arbeitshypothese, dass der Pilz mit mehreren redundanten Sekundärmetaboliten („Toxinen“) die Pathogenabwehr von Pflanzen lahm legen kann. Es erscheint daher nötig durch interdisziplinäre Ansätze (Methoden der Genomik und Metabolomik) zu erforschen, um welche Metaboliten es sich handelt, welchen Wirkungsmechanismus sie in Pflanzen haben, und wie sie von Pflanzen neutralisiert werden können. Die Detoxifikation von Metaboliten mit einer Virulenzfunktion sollte daher wesentlich zur *Fusarium*-Resistenz beitragen. Die Identifizierung solcher Kandidatengene sollte neue Wege für die *Fusarium*-Resistenzzüchtung öffnen.

Einleitung

Im Gegensatz zu Mehltau- und Rostpilzen von Getreide hat *Fusarium graminearum* (und andere „nekrotrophe“ pflanzenpathogene Pilze) ein extrem breites Wirtsspektrum. Monogene vollständige Resistenzen sind in keinem der Wirte bekannt, sondern es wurden polygen vererbte quantitative Unterschiede in der Resistenz identifiziert (BUERSTMAYER et al. 2008). Dies deutet darauf hin, dass von Seite des Pilzes multiple Virulenzmechanismen benutzt werden, die in höher resistenten Linien zumindest partiell neutralisiert werden können. Über die molekularen Mechanismen, die es *F. graminearum* erlauben ein so breites Spektrum von Pflanzen zu befallen, ist noch wenig bekannt. Die Produktion des Proteinbiosynthese-inhibitors Deoxynivalenol (DON) ermöglicht es dem Pilz die Abwehrreaktion der Wirtspflanze (zumindest partiell) lahm zu legen oder zu verzögern. Gendisruptionsmutanten, die

Abstract

The fungal pathogen *Fusarium graminearum* which causes severe diseases of small grain cereals, maize and many other plants is difficult to control. Complete genetic resistance is not available in the breeding material, fungicide treatment and biocontrol lack efficacy, and changes in agricultural practice (low tillage) increase disease pressure. Analysis of the *F. graminearum* genome has the potential to provide increased understanding of the virulence mechanisms of this pathogenic fungus. Based on the amazing content of predicted secondary metabolite biosynthesis genes our working hypothesis is that the pathogen uses redundant metabolites („toxins“) which can suppress plant defense. Interdisciplinary approaches (genomics, metabolomics) should lead to new ways to identify metabolites corresponding to gene clusters, to explore their mode of action in plants, and how they are antagonized by plants. Detoxification of metabolites with a virulence function seems to be important for *Fusarium* resistance of plants, the identification of candidate genes with such a role should open new ways for resistance breeding.

Key words:

Fusarium, polyketide synthase, non-ribosomal peptide synthase, terpenoid synthase, glucosyltransferase

keine Trichothecene mehr bilden, können sich in befallenen Weizen-Ähren nicht mehr ausbreiten. Der wirkungsvollste QTL für *Fusarium*-Ausbreitungsresistenz in Weizen geht mit erhöhter Toxinresistenz einher (LEMMENS et al. 2005), wobei DON in inaktives DON-Glucosid übergeführt wird (POPPENBERGER et al. 2003).

Durch den enormen Fortschritt in den Sequenzieretechniken und die Verfügbarkeit von Methoden der Genomforschung ist es nun möglich geworden, die Frage, welche anderen Gene für die Virulenz von *Fusarium* notwendig sind, neu zu stellen.

Werkzeuge und Ergebnisse der *Fusarium*-Genomforschung

Finanziert mit Mitteln des US Department of Agriculture (etwa 2 Millionen US \$) wurde die Sequenz des Genoms von

¹ Department für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 WIEN

* Ansprechpartner: Dr. Gerhard ADAM, gerhard.adam@boku.ac.at

Fusarium graminearum (sensu strictu) am Broad Institute ermittelt. (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/fusarium_graminearum/Home.html).

Die Genomgröße von *Fusarium graminearum* beträgt annähernd 36 Mb (Millionen Basen), und ist somit etwa 12x größer als das Genom des Bakteriums *Escherichia coli*, oder 83x kleiner als das Genom des Menschen oder anderer Säugetiere. Die Strategie war dabei, die Enden von zufälligen Klonen aus Genbanken anzusequenzieren („shotgun“ Methode), wobei solange sequenziert wurde, bis jede Base im Genom statistisch 10,6-fach abgedeckt war. Das daraus resultierende Puzzle (Sequenzen aus über 600.000 Sequenzläufen) wurde mittels eines Computerprogramms zusammengesetzt, wobei immer wieder kleine Lücken auftreten. Die Sequenz hat jedoch hervorragende Qualität, 97% aller Basen befinden sich in einer durchgängigen Sequenz („Contig“) größer 1,6 Mb.

Die Vorhersage, für welche Genprodukte die DNA Sequenz kodiert, ist bei Pilzen zur Zeit noch schwierig, da Programme zur Erkennung von Introns noch viele Fehler liefern. Verschiedene bioinformatische Algorithmen führten zu divergierenden Vorhersagen über die Zahl und Struktur der etwa 12.000 Proteine von *F. graminearum*.

Im Rahmen des österreichischen Genomforschungsprogrammes GEN-AU (Pilotprojekt FUSARIUM, Koordinator G. ADAM) wurde daher ein Schwerpunkt auf die manuelle Annotation und den benutzerfreundlichen Informationszugang gesetzt. Im Projekt wurde von Dr. Ulrich GÜLDENER (MIPS, Munich Information Center for Protein Sequences) eine für die weltweite *Fusarium*-Forschergemeinde nunmehr extrem wichtige Genomdatenbank (FGDB siehe: <http://mips.gsf.de/genre/proj/fusarium/>) erstellt (GÜLDENER et al. 2006a). Basierend auf den Genmodellen wurde mit US Mitteln ein Affymetrix Gen-Chip erstellt (GÜLDENER et al. 2006b), der es nun erlaubt, die Expression aller *Fusarium*-Gene in einem Experiment zu verfolgen. Dies führte zum Beispiel zur Identifizierung von *F. graminearum* Genen, die ausschließlich während des Befalls der Pflanze exprimiert werden. Weiters wurden Gene gefunden, die

Tabelle 1: Vergleich der Genome von *Neurospora crassa* und *Fusarium graminearum*

Eigenschaft/Proteingruppe	<i>N. crassa</i>	<i>F. graminearum</i>
Genomgröße (Kb)	38.044	36.093
Vorhergesagte Zahl an Proteinen	10.082	11.640
Vorhersage „Sekretierte Proteine“	891	1.442
Transkriptionsregulator-Proteine	114	320
Major Facilitator Superfamily	121	292
Esterase/Lipase/Thioesterase	73	169
CYP Cytochrome P450	43	115
Zucker-Transportproteine	34	91
ABC transporter	44	76
NPS (nicht-ribosomale Peptid-Synthasen)	3	20
PKS (Polyketidsynthasen)	7	15
TPS (Terpenoidsynthasen)	7	17
Pektat-Lyase	2	13
Cutinasen	2	9
Pektin-Lyase	0	4

Ausgewählte Gruppen von Proteinen sortiert nach Häufigkeit. Fett gedruckt: Genprodukte mit einer vermutlichen Rolle im Sekundärmetabolismus und Transport von Metaboliten.

nur in *F. graminearum* vorkommen, in nahe verwandten *Fusarium*-Arten jedoch nicht. Weltweit bemühen sich nun Forscher mit Hilfe dieser neuen Ressourcen attraktive Kandidatengene auszuwählen und deren Relevanz experimentell zu testen. Die Ergebnisse der Arbeiten von 45 Forschern (davon 16 aus USA und Kanada, und 21 aus Europa) wurden in einem Ende 2007 erschienen Science-Artikel (und insbesondere im Supporting Online Material) zusammengefasst (<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/317/5843/1400/DC1>, CUOMO et al. 2007). Interessant ist zum Beispiel die Fragestellung, welche Unterschiede zwischen dem Genom eines nichtpathogenen Saprophyten (z.B. *Neurospora crassa*), und dem Phytopathogen *F. graminearum* bestehen (siehe *Tabelle 1*). Zwar ist das Genom des Pathogens etwas kleiner, es kodiert jedoch für etwa 1500 Gene mehr, wobei die Zahl der vorhergesagten „sekretierten Proteine“, von denen viele eine Rolle im Angriff auf die Pflanzenzellwand spielen dürften, im Pathogen deutlich größer ist. Auffällig ist auch, dass der pathogene Pilz mehr Transkriptionsregulator-Proteine aufweist. Neben Proteinen, welche die Zellwandpolymere angreifen (in *Tabelle 1* sind nur Pektinabbauende als Beispiel gezeigt) sind vor allem Zuckertransporter im Pathogenom überrepräsentiert. Besonders augenscheinlich ist jedoch, dass *F. graminearum* über eine wesentlich höhere Kapazität zur Biosynthese und zum Transport von Sekundärmetaboliten verfügt, wobei weitgehend unbekannt ist, was die Produkte dieser Synthesewege sind. Bekannte Produkte von Polyketidsynthasen (PKS) von *F. graminearum* sind z.B. das rote Pigment (Aurofusarin) und das östrogene Mykotoxin Zearalenon (ZON). Ein wichtiges Problem für pathogene Organismen ist generell die Versorgung mit dem Spurenelement Eisen. *Fusarium* produziert dazu die Siderophore Triacetylfusarinin, Ferricrocin und Malonichrom. Diese Verbindungen sind Produkte von nicht-ribosomalen Peptidsynthasen (NPS), Inaktivierung von *NPS6* (notwendig für Triacetylfusarinin-Synthese) führt zu verminderter Virulenz (OIDE et al. 2006). Die Trichothecene (z.B. Deoxynivalenol) dagegen sind Produkte einer Terpenoidsynthese (TPS = *TRIS*), die anschließend von Cytochrom P450 (*CYP*) Enzymen weiter modifiziert werden.

Die Bäckerhefe besitzt weder *PKS* noch *NPS* Gene und hat nur 5 *TPS* und 4 *CYP* Gene. Im Gegensatz dazu ergibt die bioinformatische Vorhersage für *F. graminearum* 20 *NPS*, 15 *PKS*, 17 *TPS* und 115 *CYP* Gene. Diese Zahlen sind auch wesentlich höher als beim Saprophyt *N. crassa* (zum Vergleich siehe *Tabelle 1*). Weiters besitzt der pathogene Pilz eine viel größere Zahl von Transporterproteinen (MFS und ABC), von denen zumindest ein Teil die Funktion haben dürfte, gebildeten Sekundärmetaboliten auszuschleusen.

Mehrere dieser Gene oder Gencluster sind nach Microarray-Analysen nur während der Infektion in planta exprimiert (z.B. *PKS15*, siehe *Abbildung 1*), und die korrespondierenden Metaboliten sind folglich bisherigen chemischen Analysen von Extrakten aus inokuliertem autoklavierten Getreide entgangen. Weiters war der bisherige Fokus durch die zur Fraktionierung von Extrakten eingesetzten Bioassays auf akut toxische Substanzen eingeeengt. Unsere Hypothese ist, dass einige der *Fusarium*-Metaboliten in wesentlich subtilerer Weise die Signaltransduktion in Pflanzen

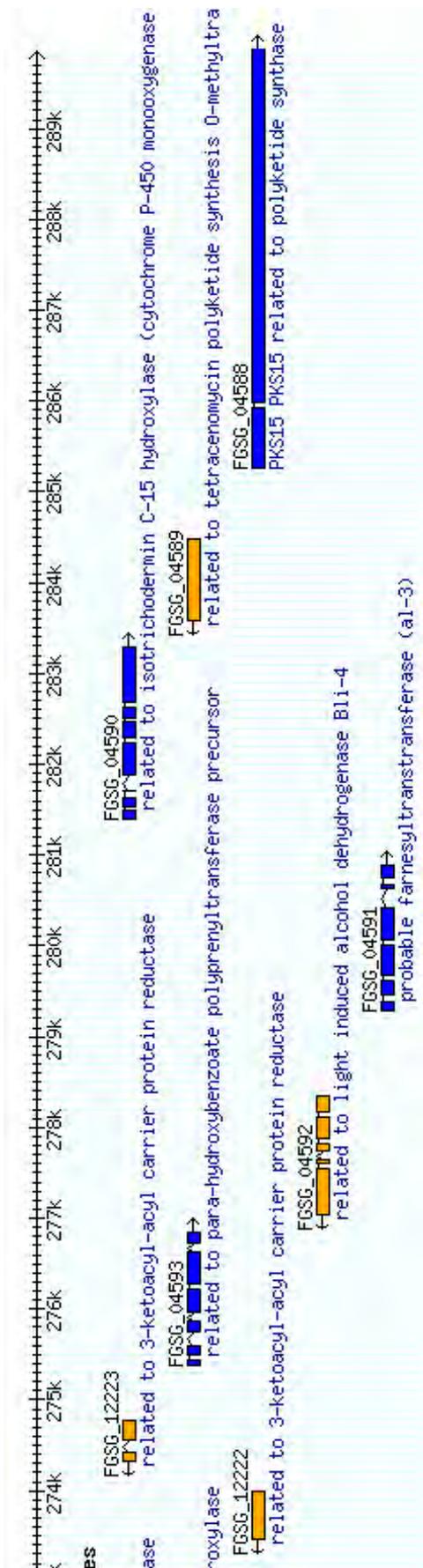


Abbildung 1. In planta induzierter Gencluster um *PKS15* (automatisierte Annotationen laut FGDB)

stören. Noch unveröffentlichte Ergebnisse unserer Gruppe zeigen dass *F. graminearum* einen kaum phytotoxischen Metabolit produziert, der Hsp90 (heat shock protein 90 kd) ATPase Inhibitor Aktivität aufweist (TORRES-ACOSTA et al., in Vorbereitung). Hsp90 ist notwendig für die korrekte Faltung und Stabilität einer Vielzahl von Proteinen mit einer Funktion als Signaltransduktionskomponenten (e.g. Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren, Produkte von Resistenzgenen). Beispielsweise interagiert Hsp90 mit dem Produkt eines Resistenzgens aus Tomate, das gegen *F. oxysporum* wirksam ist (DE LA FUENTE VAN BENTEM et al. 2005).

Die Aufklärung der Struktur der Metaboliten, die den verschiedenen bioinformatisch vorhergesagten Biosynthesegenen zuzuordnen sind, und deren Funktion in Pflanzen gehört zu den Zielen eines neuen an der BOKU eingerichteten und vom FWF (Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung, <http://www.fwf.ac.at/de/abstracts/abstract.asp?L=D&PROJ=F37>) geförderten Spezialforschungsbereichs (SFB). In diesem Projekt arbeiten Pilz-Molekularbiologen, Bioinformatiker (externer Partner MIPS - nunmehr Helmholtz Zentrum für Systembiologie, München), Pflanzenmolekularbiologen, Pflanzenzüchter, Phytopathologen und insbesondere Chemiker eng zusammen. Mit den modernen Methoden der Genomik und Metabolomik, und unter Heranziehung von Modellsysteme wie Bäckerhefe, *Arabidopsis thaliana* und *Brachypodium distachyon* sollte es möglich werden die komplexe Materie in neuem Licht zu betrachten und neue Metaboliten und ihre Funktion in Pflanzen aufzuklären. Der nächste Schritt wäre dann die Identifikation von pflanzlichen Detoxifikationsmechanismen und die Klärung der Frage, ob es diesbezüglich Unterschiede im Zuchtmaterial gibt. Dies sollte zur Identifizierung von Kandidatengen führen, wobei auch hier die Problematik der Redundanz besteht. So gibt es, als Extrembeispiel, annähernd 200 UDP-Glucosyltransferasen in Genomen diploider Gräser, die für Entgiftungsenzyme mit vermutlich überlappender Substratspezifität kodieren, sodass die Analyse in Pflanzen kaum möglich oder sehr schwierig ist. Heterologe Expression einzelner Gene in Bäckerhefe ist hier eine attraktive Option, wie am Beispiel von DON- und ZON-inaktivierenden Glucosyltransferasen von *Arabidopsis* gezeigt (POPPENBERGER et al. 2003, POPPENBERGER et al. 2006).

Danksagung

Der Autor bedankt sich beim österreichischen Genomprogramm GEN-AU und FWF (Spezialforschungsbereich F 37) für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

- BUERSTMAYR, H., T. BAN and J.A. ANDERSON, 2009: QTL mapping and marker assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat - a review. *Plant Breeding*, 128, 1-26.
- CUOMO, C.A., U. GÜLDENER, J.R. XU, F. TRAIL, B.G. TURGEON, A. DI PIETRO, J.D. WALTON, L.J. MA, S.E. BAKER, M. REP, G. ADAM, et al. and H.C. KISTLER, 2007: The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* 317(5843), 1400-2.

- DE LA FUENTE VAN BENTEM, S., J.H. VOSSEN, K.J. DE VRIES, S. VAN WEES, W.I. TAMELING, H.L. DEKKER, C.G. DE KOSTER, M.A. HARING, F.L. TAKKEN and B.J. CORNELISSEN, 2005: Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. *Plant J.* 43, 284-98.
- Güldener, U., G. MANNHAUPT, M. MÜNSTERKÖTTER, D. HAASE, M. OESTERHELD, V. STÜMPFLEN, H.W. MEWES and G. ADAM (2006a) FGDB: a comprehensive fungal genome resource on the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Nucleic Acids Res* 34, D456-8.
- GÜLDENER, U., K.Y. SEONG, J. BODDU, S. CHO, F. TRAIL, J.R. XU, G. ADAM, H.W. MEWES, G.J. MUEHLBAUER and H.C. KISTLER, 2006b: Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. *Fungal Genet Biol.* 43, 316-25.
- LEMMENS, M., U. SCHOLZ, F. BERTHILLER, C. DALL'ASTA, A. KOUTNIK, R. SCHUHMACHER, G. ADAM, H. BUERSTMAYR, A. MESTERHÁZY, R. KRŠKA and P. RUCKENBAUER, 2005: The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 1318-24.
- OIDE, S., W. MOEDER, S. KRASNOFF, D. GIBSON, H. HAAS, K. YOSHIOKA, B.G. TURGEON, 2006: *NPS6*, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *Plant Cell* 18, 2836-53.
- PERUCI, M., F. BERTHILLER, M. LEMMENS, R. SCHUHMACHER, R. KRŠKA, A. CZIFERSZKY, R. MITTERBAUER and G. ADAM, 2006: Phosphopantetheinyltransferase required for post-translational activation of polyketide synthases and non-ribosomal peptide synthases is a virulence factor of *Fusarium graminearum*. *Biol Plant Microbe Interact* 5, 580-585.
- POPENBERGER, B., F. BERTHILLER, D. LUCYSHYN, T. SIEBERER, R. SCHUHMACHER, R. KRŠKA, K. KUCHLER, J. GLÖSSL, C. LUSCHNIG and G. ADAM, 2003: Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278, 47905-14.
- POPENBERGER, B., F. BERTHILLER, H. BACHMANN, D. LUCYSHYN, C. PETERBAUER, R. MITTERBAUER, R. SCHUHMACHER, R. KRŠKA, J. GLÖSSL and G. ADAM, 2006: Heterologous expression of *Arabidopsis* UDP-glucosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae* for production of zearalenone-4-O-glucoside. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4404-10.

Genetische und molekulare Analyse von drei Pathosystemen bei Weizen und Mais - *Fusarium* & *Septoria*

Thomas Miedaner^{1*}, Martin Löffler¹, Peter Risser¹, Patrick Schweizer², Erhard Ebmeyer³, Viktor Korzun³, Bettina Kessel⁴ und Milena Ouzunova⁴

Abstract

Wheat and maize are the most important and profitable crops in Europe. They are grown with high proportions in crop rotations, often in no-till systems to reduce production costs and soil erosion. This practice favours infections by *Fusarium* head blight (FHB, *Fusarium graminearum*) and *Septoria* leaf blotch (STB, *Septoria tritici*) in wheat, and *Fusarium* ear rot (FER, *F. graminearum*, *F. verticillioides*) in maize. For comprehensively understanding these three pathosystems the diversity within host and pathogen populations and their interaction should be analysed as well as the responsible genome regions by QTL mapping, and candidate genes by expression profiling should be searched. An ultimate goal is to reveal broad-spectrum resistance QTL and common gene expression data for resistance to FHB and STB in wheat and FER in maize by meta-analysis. QTL with the highest effects can directly be applied in practical breeding programs and are the starting point for further functional genome analysis.

Key words: *Fusarium* head blight - *Septoria tritici* blotch - *Fusarium* ear rot - wheat - maize - broad-spectrum resistance QTL

Einleitung

Weizen und Mais sind in der EU die derzeit wichtigsten Fruchtarten, die auf 8,0 bzw. 24,8 Millionen Hektar angebaut werden, häufig in hohen Anteilen in der Fruchtfolge, bei zunehmend reduzierter Bodenbearbeitung und intensivem Pflanzenbau. Diese Faktoren begünstigen den Befall von Weizen und Mais mit *Fusarium*-Arten und von Weizen mit *Septoria tritici*. Beide Erregergruppen können nur schwer durch Fungizide kontrolliert werden. Bei *Fusarium*-Arten muss die Spritzung direkt zur Blüte erfolgen und hat trotzdem nur einen reduzierten Wirkungsgrad. *Septoria tritici* zeigt seit 2004 in Europa eine zunehmende Resistenz gegen Strobilurine. Auch Mais wird von *Fusarium*-Arten befallen, neben *F. graminearum* spielt hier *F. verticillioides* eine Rolle. Beide Arten produzieren Mykotoxine, die gesundheitsschädlich für Mensch und Tier sind. Das langfristig sicherste und umweltfreundlichste Mittel, um Ertragsschä-

den und Toxinkontamination der Ernte zu begrenzen, ist Resistenzzüchtung.

Integrativer Ansatz zur Resistenzforschung

Die Resistenz gegen alle drei Erreger ist quantitativ vererbt, d.h. spaltende Nachkommen zeigen eine kontinuierliche Variation von wenig bis hoch anfällig. Bei *Septoria tritici* gibt es zusätzlich isolatspezifische Resistenzen. Eine weitere Gemeinsamkeit ist der hohe Einfluss der Genotyp x Umwelt-Wechselwirkung auf die Krankheitsresistenzen. Der wissenschaftliche Erkenntnisstand ist bei den drei untersuchten Pathosystemen Weizen/Ährenfusariosen, Weizen/Blattseptoria und Mais/Kolbenfusariosen sehr unterschiedlich. Bei Weizen/Ährenfusariosen sind durch intensive internationale Forschungstätigkeit der letzten zwanzig Jahre die methodischen und genetischen Grundlagen zur Resistenzselektion bekannt, es liegen zahlreiche QTL- (*quantitative-trait loci*) Studien vor (s. BÜRSTMAYR et al. 2008). Bei Weizen/Blattseptoria sind fünfzehn isolatspezifische *Stb*-Gene beschrieben, von denen 13 mit molekularen Markern kartiert sind (GOODWIN 2007). Über die Vererbung der Resistenz in deutschen Sorten ist praktisch nichts bekannt, es wurden aber deutliche Sortenunterschiede in Feldversuchen mit Isolatgemischen gefunden (RODEMANN, pers. Mitt.). Keine Studien gibt es über die Vererbung der Resistenz bei Mais/Kolbenfusariosen in europäischem Material. Zu einem vertieften Verständnis der genetischen und molekularen Mechanismen der diesen Pathosystemen zugrunde liegenden Resistenzen ist ein Gesamtansatz mit Integration von genetischen, molekularen und genomanalytischen Methoden erforderlich (*Abbildung 1*).

Genetische Diversität in Wirts- und Pathogenpopulationen und deren Interaktion

Eine große genetische Diversität von Wirtspopulationen ist die Basis züchterischen Handels, diejenige von Pathogenpopulationen bedroht dagegen die Fortschritte der Resistenzselektion, vor allem, wenn eine signifikante Wirt-Pathogen-Interaktion vorliegt. Das Paradebeispiel ist die meist geringe Dauerhaftigkeit von monogenischen Resistenzen bei Rosten und Mehltau. Aufgrund der großen

¹ Universität Hohenheim, Landessaatzuchtanstalt, D-70593 STUTTGART

² IPK Gatersleben, D-06466 GATERSLEBEN

³ KWS LOCHOW GMBH, D-29296 BERGEN

⁴ KWS SAAT AG, D-37555 EINBECK

* Ansprechpartner: Prof. Dr. Thomas MIEDANER, miedaner@uni-hohenheim.de

Ziele	Weizen <i>Fusarium</i>	Weizen <i>Septoria</i>	Mais <i>Fusarium</i>
Genetische Diversität von Wirts- und Pathogenpopulationen	Hohe Diversität Keine Spezialisierung	Diff.sortiment Virulenzanalysen Quantitativ-genetische Analyse	Aggressivitätstest Linienprüfung
Identifikation und Charakterisierung von genomischen Regionen	30 Populationen 101 QTL	FÜNF Populationen	ZWEI Populationen
Kandidatengen-Detektion und -Verifikation	Genexpression + Verification (QTL-Koklokalisierung, VIGS)		
Meta-Analyse über Pathosysteme	Meta-Analyse von QTL- bzw. Expressionsdaten		

Abbildung 1: Integrativer Ansatz zur Aufklärung der Resistenzgenetik von drei Pathosystemen (kursiv = Literaturergebnisse, weitere Erläuterungen siehe Text)

Diversität der Pathogenpopulationen und der extrem hohen Wirt-Pathogen-Interaktion selektieren sich rasch virulente Rassen gegen neue Resistenzgene.

Eine genaue phänotypische Merkmalerfassung ist eine wesentliche Voraussetzung für eine QTL-Kartierung. In der Weizenpopulation History x Rubens erwies sich die Sorte History als Resistenzträger für Ährenfusariosen (VOSS et al. 2008) bzw. *Septoria tritici*, eine ideale Voraussetzung für das Auffinden von Meta-QTL (Abbildung 2). Eine ausreichende Heritabilität ergibt sich deshalb nur bei Infektionsversuchen über mehrere Umwelten (Ort x Jahr-Kombinationen), sie betrug 0,93 bei Weizen/Ährenfusariosen und 0,75 bei Weizen/Blattseptoria (Abbildung 2).

Bei Ährenfusariosen sind keine Wechselwirkungen von Isolat mit Wirtsgenotypen bekannt. Trotzdem gibt es große Unterschiede in der Aggressivität der Isolate. Es wäre deshalb denkbar, dass durch weite Verbreitung stark wirkender Resistenzquellen das allgemeine Aggressivitätsniveau der *Fusarium*-Populationen steigt. Genetisch ist dies durchaus möglich, da in der Nachkommenschaft einer Kreuzung von zwei *F. graminearum*-Isolaten eine große genetische Varianz für Aggressivität auftrat, die auch Transgressionen einschloss, in einer anderen Nachkommenschaft wurde ein Major-QTL für Aggressivität detektiert (s. MIEDANER

et al. 2008). Hochresistente Weizengenotypen, die sowohl *Fhb1* als auch das Resistenzallel von *Qfhs.ifa-5A* enthielten, kontrollierten im Feldversuch höchst aggressive Isolate. Auch bei Mais gibt es große Unterschiede in der Aggressivität und Mykotoxinbildung einzelner *Fusarium*-Isolate und es findet sich keine Interaktion mit Maislinien.

Anders verhält sich die Wirt-Pathogen-Interaktion bei *Septoria tritici*. Es sind neben quantitativ vererbten Resistenzen bisher 15 isolatspezifische *Stb*-Gene bekannt, die mit den Weizensorten interagieren (GOODWIN 2007). Die Dauerhaftigkeit dieser Gene scheint beschränkt. Das *Stb6*-Gen, das in vielen europäischen Sorten vorkommt, ist nur noch wenig wirksam und viele *S. tritici*-Isolate haben komplexe Virulenzen. Es gibt bereits französische Isolate in der natürlichen Population, die die laut Literatur hocheffektiven Resistenzquellen Arina, Veranopolis, Israel 493, Synthetik CS 7D, Senat, Tatinia im Keimlingsstadium vollständig befallen (HARTL, pers. Mitt.), obwohl einzelne dieser Resistenzquellen bereits mehrere *Stb*-Gene enthalten (Pyramidisierung). Dies erklärt sich aufgrund der sehr großen genetischen Diversität und erheblichen Dynamik von *S. tritici*-Populationen (MCDONALD und LINDE 2002). Deshalb ist die Charakterisierung von isolatunabhängig wirkenden, quantitativen Resistenzen vordringlich. Dazu ist die Kenntnis der Virulenz der verwendeten Isolate und des Vorhandenseins von *Stb*-Genen in den Kartierungseltern unabdingbar.

Identifikation und Charakterisierung genomischer Regionen (QTL)

Das Beispiel Weizen/Ährenfusariosen zeigt deutlich die Möglichkeiten und Grenzen der QTL-Kartierung. Dabei ist die Detektion von QTL in der Kartierungspopulation nur ein erster Schritt, der gefolgt werden sollte von einer Verifikation der QTL-Positionen und -Effekte (R^2) in aus dieser Population gewonnenen QTL-NILs (nahe-isogenischen Linien) bzw. - für den Züchter noch wichtiger - in einem anderen genetischen Hintergrund und anderen Umwelten. Ein letzter Verifikationsschritt ist dann die erfolgreiche Durchführung einer markergestützten Selektion (MAS) oder markergestützten Rückkreuzung. In diesem

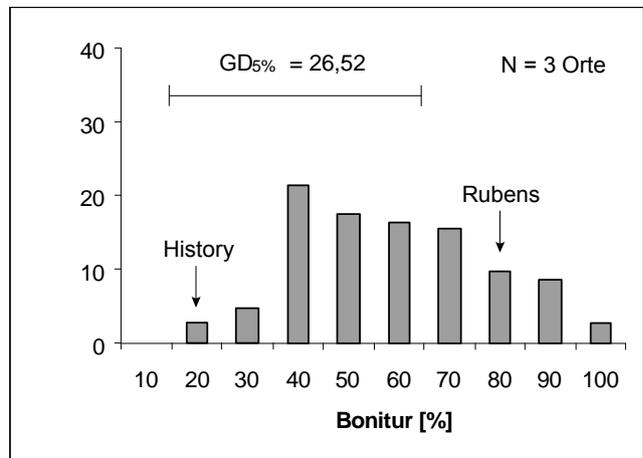
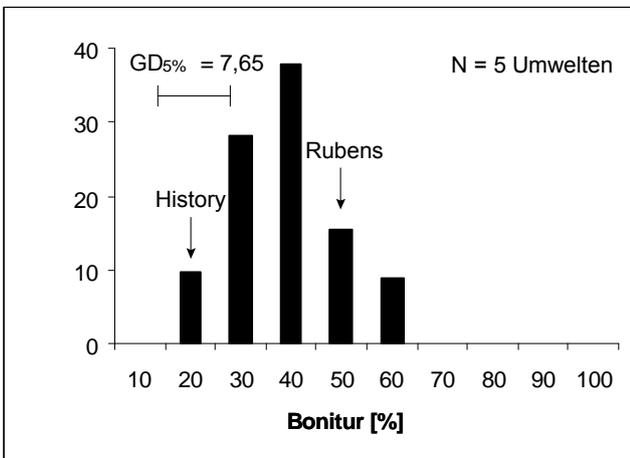


Abbildung 2: Merkmalsverteilung der Weizenpopulation History x Rubens (N=103) für die Resistenz gegen Ährenfusariosen (links) bzw. Blattseptoria (rechts)

Pathosystem sind bis heute mindestens 176 QTL aus 30 verschiedenen Populationen beschrieben (Abbildung 3, LÖFFLER et al. 2009). Die meisten dieser QTL haben nur kleine Effekte ($R^2 < 10\%$), nur wenige davon wurden bisher verifiziert und noch weniger für eine MAS eingesetzt (BÜRSTMAYR et al. 2008). Interessanterweise tragen alle Chromosomen QTL für Resistenz gegen Ährenfusariosen, vier genomische Bereiche fallen durch eine besonders hohe Dichte auf: 1B, 3B, 5A und 6B. Während auf Chromosom 3BS nur asiatische Resistenzquellen kartieren, finden sich in den anderen Bereichen sowohl europäische als auch asiatische Quellen. Nur *Fhb1* aus ‚Sumai 3‘ auf Chromosom 3BS konnte bis heute alle genannten Verifikationsschritte in amerikanischem und europäischem Weizenmaterial (s. BÜRSTMAYR et al. 2008) erfolgreich durchlaufen. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem QTL auf Chromosom 5A (*Qfhs.ifa-5A*) erzielt. Beide QTL reduzierten auch signifikant den DON-Gehalt. Bei der Verifikation wurde deutlich, dass selbst bei QTL mit großen Effekten in der Kartierungspopulation erhebliche Einbußen in ihrer Wirkung bei der Übertragung in unabhängiges Zuchtmaterial hingenommen werden muss. Dies gilt auch für zwei QTL aus Winterweizenpopulationen (*Qfhs.lft-6AL* und *Qfhs.lft-7BS* aus ‚Dream‘), die erfolgreich verifiziert wurden (HÄBERLE et al. 2007), wobei aber im Durchschnitt nur rund die Hälfte der Effekte in anderem genetischen Hintergrund wiedergefunden wurde (MIEDANER et al. 2008c). Erschwerend für den züchterischen Einsatz kommt hinzu, dass manche QTL, wie etwa *Qfhs.lft-6AL*, mit QTL für Strohlänge gekoppelt sind und sich dieser Effekt natürlich auch in der MAS niederschlägt (HÄBERLE et al. 2007). Um kurzstrohige Linien mit dem entsprechenden QTL-Allel zu finden, müssen größere Populationsumfänge geprüft werden als wenn keine Kopplung vorliegt. Ist die Kopplung sehr eng, kann dies den Einsatz des QTL in der praktischen Züchtung völlig verhindern.

Bei Weizen/Blattseptoria steckt die QTL-Kartierung noch in den Anfängen. Bisher gibt es nur zwei Arbeiten mit geringen Populationsumfängen. Für die Quelle ‚Senat‘, die *Stb6* enthält, fanden ERIKSEN et al. (2003) zusätzlich vier QTL auf den Chromosomen 2B, 3A, 6B und 7B, die zusammen 62 bis 78% der phänotypischen Varianz erklären. In ‚Arina‘ wurde in einer Population von 63 DH-Linien ein QTL auf Chromosom 6B kartiert, der 24% der Varianz erklärt (CHARTRAIN et al. 2004). Durch geschickte Wahl des Isolates ist es auch möglich, in derselben Weizenpopulation qualitative *Stb*-Gene im Keimlingsstadium und QTL im Adultpflanzstadium im Feld zu kartieren (ERIKSEN et al. 2003).

Ähnliches gilt für Mais/Kolbenfusariosen. Hier sind bisher eine kanadische Population zur Resistenz gegen *F. graminearum* sowie drei US-amerikanische Populationen zur Resistenz gegen *F. verticillioides* kartiert (s. MIEDANER et al. 2008b). Bei der kanadischen Population wurden für die Narbeninfektion zwei QTL detektiert, die bis zu 32,5% der phänotypischen Varianz erklärten. Bei den amerikanischen Populationen waren die Effekte deutlich kleiner (4-22%).

Genom	Chromosom							Total
	1	2	3	4	5	6	7	
A	4	6	7	4	16	3	8	48
B	16	12	29	8	9	11	9	94
D	3	10	6	9	2	2	2	34
Total	23	28	42	21	27	16	19	176

Abbildung 3: Publierte QTL für Resistenz gegen Ährenfusariosen bei hexaploidem Weizen nach ihrer Lokalisation; hervorgehoben sind Regionen mit besonderer QTL-Dichte (LÖFFLER et al. 2009)

Kandidatengen-Detektion und -Verifikation

Kandidatengene sind Gene, von denen man vermutet, dass sie bei der Expression eines Merkmals eine Funktion haben. Beispielsweise sind alle Gene, die in Pflanzen bei der Erkennung, Signalübertragung und Abwehr von Pilzen eine Funktion ausüben, Kandidatengene für Resistenz. Wenn es sich dabei um eine quantitative Resistenz handelt, hat ein Kandidatengen, ähnlich wie ein QTL, auch nur einen begrenzten Einfluss auf das Merkmal. Durch genomweite Genexpressionsstudien können Kandidatengene gefunden werden, die bei Befall spezifisch an- oder abgeschaltet werden. Dabei ist die Suche umso erfolgversprechender, je spezifischer das Pflanzenmaterial ist. Am besten geeignet sind nahe-isogenische Linien (NIL), die sich nur in einzelnen QTL oder einer Kombination von wenigen QTL unterscheiden. Diesen Ansatz haben wir für Expressionsstudien im Pathosystem Weizen/Ährenfusariosen gewählt. Im Pathosystem Weizen/Blattseptoria steht solches Material derzeit nicht zur Verfügung. Deshalb wurden hier aus einer für die Resistenz spaltenden Population je 10 Linien ausgewählt, die phänotypisch zu den jeweils besten bzw. schlechtesten Linien zählten. Diese werden jeweils zusammengefasst („bulk segregant analysis“), um in den Genexpressionsstudien den unterschiedlichen genetischen Hintergrund auszuschalten. Beide Projekte werden derzeit im IPK Gatersleben (AG Dr. Patrick SCHWEIZER) bearbeitet. Die RNA wird in Gewächshausversuchen gewonnen, bei Weizen/Ährenfusariosen nach einer Punktinokulation der Ähre zur Vollblüte, bei Weizen/Blattseptoria im Jungpflanzenstadium nach Sprühinokulation der Blätter.

Eine wichtige Rolle spielt nach der Identifikation der Kandidatengene ihre Verifikation. In einem ersten Ansatz sollen sie in eine Karte derselben Population, aus der das Material gewonnen wurde, integriert werden. Kandidatengene, die eine Ko-Lokalisation mit einzelnen QTL zeigen, werden dann durch eine systemische Virusinfektion abgeschaltet (virus-induced gene silencing, VIGS) und ihre Wirkung auf die Merkmalsausprägung untersucht. Dabei wird mit dem jeweiligen Gen interferierende RNA (RNAi) durch Viren in Pflanzenzellen eingeschleust. Bei ausreichender Sequenzhomologie zur Ziel-RNA wird diese im Zytoplasma abgebaut. Wenn die Resistenz durch das Ausschalten eines Kandidatengens signifikant verringert wird, dann ist der Beweis erbracht, dass es eine Rolle für die untersuchte Resistenz spielt.

Meta-Analyse innerhalb und zwischen Pathosystemen

Eine Meta-Analyse ist ein statistisches Verfahren, das die Ergebnisse einer großen Zahl von Studien zusammenfasst und weiterverarbeitet. GOFFINET and GERBER (2000) schlugen es als ein Werkzeug vor, das über Konsensus-Karten gemeinsame Positionen von QTL aus verschiedenen Kartierungspopulationen entdeckt. Dies bezieht sich auf gemeinsame Resistenzloci (1) in verschiedenen Kreuzungspopulationen desselben Pathosystems, (2) gegen mehrere Arten desselben Pathogens beim selben Wirt (Mais/*F. graminearum* vs. *F. verticillioides*), (3) verschiedene Pathogentaxa beim selben Wirt (Weizen/*Fusarium* vs. *Septoria*), (4) über Wirte hinweg (Mais/*Fusarium* vs. Weizen/*Fusarium*) oder (5) über Pathogentaxa und Wirte hinweg.

Wir führten eine Meta-Analyse für das Pathosystem Weizen/Ährenfusariosen durch. Sie lässt Rückschlüsse auf die genetische Architektur eines quantitativen Merkmals zu und zeigt beispielsweise, welche Resistenzquellen unterschiedliche QTL tragen und welche QTL aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation züchterisch kombiniert werden können. Unter Nutzung des Software-Pakets „MetaQTL“ wurden die QTL von 30 Weizenpopulationen aus 23 Publikationen untersucht (LÖFFLER et al. 2009). Dabei ergaben sich 19 Meta-QTL, also genomische Bereiche, in denen jeweils 2-13 QTL zusammengefasst werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit dieselbe Lokalisation haben. Sie lagen auf 12 Chromosomen. Die erklärte phänotypische Varianz der diesen Meta-QTL zugrundeliegenden QTL lag zwischen 5 und 19%. Damit erweist sich diese Resistenz als ein quantitatives Merkmal mit einer Vielzahl von Resistenzallelen, die über das gesamte Weizengenom verteilt sind. Die Effekte sind im Durchschnitt aber höher als bei typisch quantitativ vererbten Merkmalen, wie etwa Wuchshöhe.

Im Rahmen des Projektes soll geklärt werden, ob bei den untersuchten Pathosystemen eine „Breitspektrum-Resistenz“ vorliegt, wie sie bei anderen Kulturpflanzen beschrieben wurde. Bei Reis trugen 22 von 108 genomischen Regionen (bins) QTL für mehr als eine Krankheitsresistenz als die Re-

sistenzen gegen drei pilzliche, einen bakteriellen und einen viralen Erreger untersucht wurden (WISSER et al., 2005). Ein Segment auf Chromosom 9 enthielt gar acht QTL für vier Krankheiten, 22% der translatierten cDNAs konnten mit Pflanzen-Abwehrreaktionen assoziiert werden. Auf ähnliche Weise projizierten Jo et al. (2008) QTL von fünf Pathosystemen auf das Reisgenom und fanden eine Übereinstimmung der Lokalisation von Genen/QTL in spezifischen Regionen. Auch auf dem Weizenchromosom 3BS ist eine solche Häufung von Resistenzloci der unterschiedlichsten Krankheiten auffällig (Abbildung 4). Es finden sich hier in einem Intervall von 12-15 cM monogenische Resistenzen gegen sieben Pathosysteme: Weizen-Schwarzrost (*Sr2*), Weizen-Braunrost (*Lr27*), Weizen-Gelbrost (*Yrns-B1*), eine syntäne Region für Resistenz gegen Maisrost (*Rp7*) sowie zwei Haupt-QTL gegen Ährenfusariosen (*Fhb1*) und Ährenseptoria (*Stagonospora nodorum*). Dies zeigt, dass der Vergleich verschiedener Pathosysteme neue Erkenntnisse über Regionen mit gemeinsamen Genen/QTL („hot spots“) bringen kann.

Schlussfolgerungen

Resistenzzüchtung ist derzeit das aussichtsreichste Mittel, um eine dauerhafte Kontrolle der Pathogene in den drei Pathosystemen Weizen/Ährenfusariosen, Weizen/Blattseptoria, Mais/Kolbenfusariosen zu erreichen. Eine zukunftsgerichtete Resistenzgenetik sollte die Diversität von Wirts- und Pathogenpopulationen sowie deren Interaktion berücksichtigen und alle verfügbaren genetischen, molekularen und genomanalytischen Methoden einsetzen und dabei möglichst viele Populationen innerhalb eines Pathosystems bzw. verschiedene Pathosysteme vergleichend betrachten. Eine solche Meta-Analyse kann die gefundenen QTL und Kandidatengene statistisch vergleichen und solche herausfiltern, die gleichzeitig in mehreren Populationen bzw. Pathosystemen wirksam sind. Für die Forschung sind aber auch solche QTL/Gene interessant, die spezifisch nur in einzelnen Pathosystemen exprimiert werden, da sie wesentliche Informationen über molekulare Erkennungsprozesse zulassen. Die QTL/Gene mit den größten Effekten können direkt in Züchtungsprogramme eingespeist werden und sind gleichzeitig Ausgangspunkt für die weitere funktionelle Genomanalyse, etwa durch TILLING oder Klonierung von QTL. Resistente Sorten werden den Fungizideinsatz bei Septoriosen verringern, bei allen genannten Erregern ertragssichernd wirken und zu einer deutlich verringerten Kontamination mit Mykotoxinen führen.

Anmerkung

Wesentliche Teile dieser Arbeit werden finanziell unterstützt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen der ERA-Net PG-Initiative CEREHEALTH (Fördernummer 0313992) sowie durch die KWS SAAT AG, Einbeck und die KWS LOCHOW GMBH, Bergen.

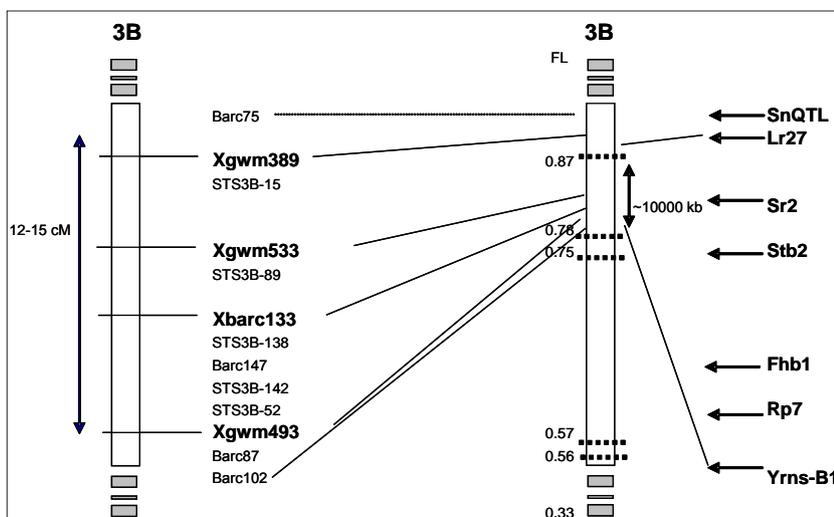


Abbildung 4: Ausschnitt aus der genetischen (links) bzw. physikalischen (rechts) Karte des Weizenchromosoms 3BS mit Angabe der lokalisierten Resistenzgene/QTL

Literatur

Aufgrund der Kürze des Artikels konnten nur neuere Arbeiten und reviewartige Literaturstellen angegeben werden, alle weiteren Literaturangaben finden sich dort.

- BUERSTMAYR, H., T. BAN and J.A. ANDERSON, 2009: QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding*, 128, 1-26.
- GOFFINET, B. and S. GERBER, 2000: Quantitative trait loci: A meta-analysis. *Genetics* 155:463-473.
- GOODWIN, S.B., 2007: Back to basics and beyond: Increasing the level of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Australas. Plant Pathol.* 36:532-538.
- HÄBERLE, J., M. SCHMOLKE, G. SCHWEIZER, V. KORZUN, E. EBMEYER, G. ZIMMERMANN and L. HARTL, 2007: Effects of two major *Fusarium* head blight resistance QTL verified in a winter wheat backcross population. *Crop Sci* 47:1823-1831.
- JO, Y.-K., R. BARKER, W. PFENDER, S. WARNKE, S.-C. SIM and G. JUNG, 2008: Comparative analysis of multiple disease resistance in ryegrass and cereal crops. *Theor. Appl. Genet.* 117:531-543.
- LÖFFLER, M., C.C. SCHÖN and T. MIEDANER, 2009: Revealing the genetic architecture of FHB resistance in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) by QTL meta-analysis. *Mol. Breeding*, 166, 219-227.
- MCDONALD, B.A. and C. LINDE, 2002: The population genetics of plant pathogens and breeding for durable resistance. *Euphytica* 124:163-180.
- MIEDANER, T., C.J.R. CUMAGUN and S. CHAKRABORTY, 2008a: Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *J. Phytopathology* 156: 129-139.
- MIEDANER, T., M. LÖFFLER, C. BOLDUAN, B. KESSEL, M. OUZUNOVA, V. MIRDITA and A.E. MELCHINGER, 2008b: Genetic variation for resistance and mycotoxin content of European maize inoculated with *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides*. *Cereal Res. Commun.* 36 (Suppl. C): 45-48.
- MIEDANER, T., F. WILDE, V. KORZUN, E. EBMEYER, M. SCHMOLKE, L. HARTL and C.C. SCHÖN, 2008c: Marker selection for *Fusarium* head blight resistance based on quantitative trait loci (QTL) from two European sources compared to phenotypic selection in winter wheat *Euphytica*, 166, 219-227.
- VOSS, H.-H., J. HOLZAPFEL, L. HARTL, V. KORZUN, F. RABENSTEIN, E. EBMEYER, H. COESTER, H. KEMPF and T. MIEDANER, 2008: Effect of the *Rht-D1* dwarfing locus on *Fusarium* head blight rating in three segregating populations of winter wheat. *Plant Breeding* 127: 333-339.
- WISSER, R.J., Q. SUN, S.H. HULBERT, S. KRESOVICH and R.J. NELSON, 2005: Identification and characterization of regions of the rice genome associated with broad-spectrum, quantitative disease resistance. *Genetics* 169: 2277-2293.

Die Bewertung der Ährenfusariosenresistenz bei in der Tschechischen Republik registrierten Winterweizensorten unter verschiedenen Prüfungsmethoden

Jana Chrpová^{1*}, M. Váňová² und V. Šíp¹

Abstract

Resistance of winter wheat cultivars to Fusarium head blight (FHB) and accumulation of mycotoxin deoxynivalenol was evaluated in three different experiments: 1. spray inoculation of selected spikes at full flowering stage with pathogenic isolate of *Fusarium culmorum*, 2. surface inoculation of the whole plots with the mixture of selected *F.culmorum* and *F.graminearum* isolates and 3. at the conditions of natural infection supported by cultivation after preceding crop maize and with application of maize debris (stalks and corncobs). The susceptibility to FHB in cultivars Mladka and Complet was detected in all three experiments, similarly as the relatively highest resistance to FHB in Alana. Cultivar differences in resistance level were most reliably detected with the use of spray inoculation of selected spikes and promotion of infection by mist irrigation of plots. Evidently it was useful to combine the results obtained with this method with results obtained in conditions of natural infection supported by „maize sources“. It is, however, necessary to mention that natural infection is highly influenced by weather conditions during the year. The results obtained also indicate a possibility to obtain a desirable resistance level in cultivars developed after crossing of commercially grown cultivars.

Keywords: Wheat, Fusarium head blight, resistance, deoxynivalenol, methods of evaluation

Einleitung

Die Ährenfusariosen gehören zu den ernstesten Getreidekrankheiten. Außer einem geringeren Ertrag hat sie auch die Anwesenheit von Mykotoxinen im geernteten Korn und einen negativen Einfluss auf die technologische Qualität zur Folge. Die bisherigen Studien zeigten, dass das überwiegende Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) ist, das zu den Trichothecen-Derivaten gehört (NICHOLSON et al. 2007). Hauptproduzenten dieser Mykotoxine sind die Arten *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* und *F. poae*.

Die Resistenz von Weizen gegen Ährenfusariosen ist polygen begründet und hat verschiedene Komponenten. Bei der Bewertung der Resistenz von Weizensorten wurde vor

allem die Resistenz gegen die Invasion von Pathogenen (I), die Resistenz gegen die Verbreitung des Pathogens in der Ähre (II) (SCHROEDER und CHRISTENSEN 1963) und die Resistenz gegen die Anhäufung von Mykotoxinen im Korn (Resistenz des Typs III) betrachtet. Sorten von Sommerweizen mit einem hohen Resistenzniveau kommen vor allem aus dem Gebiet von China und Japan und entstanden vorwiegend in Gebieten, in denen regelmäßig Epidemien ausbrachen, weswegen durch natürliche Auswahl widerstandsfähigere Genotypen erzeugt wurden. Bei Weizen kann jedoch ein bedeutender Fortschritt in der Erhöhung der Resistenz gegen Ährenfusariose auch durch Kumulierung von Resistenzgenen aus verschiedenen Quellen erreicht werden, die an europäische Bedingungen angepasst werden (ITTU et al. 2002). Eine spezifische Methode, die zur Feststellung der Resistenz des Typs II genutzt wird, gründet sich auf die Einbringung von Inokula in die Zentralähre in der Zeit der Blüte (SCHROEDER und CHRISTENSEN 1963).

Durch Inokulation mittels Besprühen der Ähren kann die Resistenz des Typs I und des Typs II festgestellt werden. Nach den gegenwärtigen Erkenntnissen kann die Resistenz des Typs I nicht direkt festgestellt werden, sondern nur als Unterschied zwischen Punktinfektion und Infektion durch Besprühen.

Für die Züchtung ist die Inokulation durch Besprühen geeigneter, denn sie ermöglicht eine bessere Beurteilung der Wirkung eines breiteren genetischen Apparats als die Punktinfektion (MESTERHÁZY et al. 2008). Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung des natürlichen Infektionswegs unter Provokationsbedingungen (Vorfrucht Mais oder Getreide, Minimalbodenbearbeitung) für die Bewertung der Resistenz der Sorten (BÜRSTMAYR et al. 1999). Ziel dieses Beitrags ist es, die einzelnen Methoden der Infektion zu vergleichen und unter Verwendung verschiedener Typen der Infektion die Informationen über die Resistenz von Sorten des Winterweizens zu erweitern.

Durchführung der Feldprüfungen

Für die Bewertung der Ährenfusarioseresistenz wurden 3 verschiedene Verfahren angewandt.

Seit 2004 wird die Ährenfusarioseresistenz in der Tschechischen Republik bei den registrierten Winterweizensorten in Zusammenarbeit mit dem Forschungsinstitut für Pflanzenproduktion (VÚRV), Prag-Ruzyně und der Landwirtschaftlichen Zentralanstalt für Kontrolle und Prüfung (ÚKZÚZ), Brno (Brünn), in 2 Versuchstypen festgestellt. Für diese Studie wurden die in den Jahren 2004-2006 erlangten Ergebnisse für 35 Winterweizensorten verwendet.

¹ Forschungsinstitut für Pflanzenproduktion, Drnovská 507, CZ-161 06 PRAHA-RUZYŇĚ

² Dipl.-Ing. Marie VÁŇOVÁ, Institut für landwirtschaftliche Forschung GmbH, Havlíčkova 2787, CZ-767 01 KROMĚŘÍŽ

* Ansprechpartner: Dipl.-Ing. Jana CHRPOVÁ, chrpova@vurv.cz

Tabelle 1: Ährensymptome (ÄS) und DON Gehalt. Ergebnisse aus Feldversuchen über 3 Jahre (2004-2006) mit 2 verschiedenen Formen der Infektion

Sorte	Natürliche Infektion		Künstliche Inokulation		Sorte	Natürliche Infektion		Künstliche Inokulation	
	ÄS	DON (mg/kg)	ÄS	DON (mg/kg)		ÄS	DON (mg/kg)	ÄS	DON (mg/kg)
Alana	4,8	1,3	4,2	29,7	Cubus	5,9	4,0	4,9	59,5
Simila	4,8	1,3	4,0	30,4	Rapsodia	6,3	6,4	5,6	43,1
Samanta	6,0	1,9	5,0	30,0	Svitava	7,0	5,9	6,1	53,4
Apache	5,8	2,6	5,4	24,4	Caphorn	6,8	11,7	6,3	51,2
Rheia	6,6	3,0	5,2	31,0	Baroko	6,3	6,2	5,3	61,5
Dromos	4,4	2,3	4,5	44,7	Etela	5,1	4,9	6,2	69,0
Ludwig	5,1	3,0	4,7	41,4	Drifter	5,0	3,9	6,3	91,4
Banquet	6,2	3,4	5,5	31,8	Darwin	5,6	5,4	6,3	68,9
Globus	4,8	3,4	5,5	44,4	Alibaba	5,1	4,7	6,3	76,4
Batis	3,7	1,8	4,9	63,3	Vlasta	5,7	6,2	6,3	68,9
Eurofit	5,1	2,7	4,9	53,5	Karolinum	6,1	9,1	5,7	61,1
Hedvika	3,8	2,6	5,1	59,5	Clarus	5,6	5,1	6,4	79,9
Buteo	5,3	4,0	5,2	51,2	Heroldo	5,4	6,2	5,8	92,6
Ebi	4,3	1,5	5,0	79,7	Biscay	5,7	7,3	6,1	90,2
Ilias	3,6	2,6	5,6	66,8	Florett	5,9	9,1	6,1	91,6
Akteur	3,9	2,2	5,7	73,3	Complet	5,7	6,7	7,0	128,5
Sulamit	6,2	4,4	5,1	52,7	Mladka	7,7	8,0	6,2	127,6
Merrito	5,2	4,3	5,1	57,8	Durchschnitt	5,0	2,7	5,0	48,1

1. In der ÚKZÚZ wird die Methode des natürlichen Infektionswegs auf Feldern mit der Vorfrucht Mais mit einer bestimmten Menge von Maisresten auf der Erdoberfläche angewandt. Der Erreger des Befalls ist hier vor allem *F. graminearum*. Der Befall wurde als Prozentsatz der befallenen Ähren nach der Methodik der ÚKZÚZ ermittelt, und der DON-Gehalt wurde aus allen Ähren der natürlich infizierten Parzelle bestimmt.
2. Bei den Versuchen im VÚRV Ruzyně wird eine künstliche Inokulation von 10 Ähren in der gleichen Entwicklungsphase (GS 64 - Zadoks) durch Suspension von Konidien des pathogenen Isolats (B) der Art *F. culmorum* durchgeführt (CHRPOVÁ et al. 2007). Der Befall der Ähren wurde als Prozentsatz der infizierten Ähren in 3 Terminen festgestellt. Der DON-Gehalt wurde aus 10 Ähren nach der Methode ELISA bestimmt. Zur Unterstützung der Entwicklung der Infektion wird bewässert.
3. Im Institut für landwirtschaftliche Forschung in Kroměříž (Kremsier) wurden 22 der registrierten Winterweizensorten in dreijährigen Feldversuchen bewertet. Der Versuch wurde in den Jahren 2005 und 2006 mit der Vorfrucht Körnermais und im Jahre 2007 mit der Vorfrucht Getreide unternommen. Die Infizierung erfolgte auf dem gesamten Feld durch Besprühen mittels Rückensprüher mit einem Gemisch von Isolat der Arten *F. culmorum* und *F. graminearum*. Der Ährenbefall durch Fusariose wurde nach der modifizierten Horsfall-Barnet 10-Punkte-Skala bewertet. Nach der Ernte wurde im Labortest der Prozentsatz der durch Pathogene der

Gattung *Fusarium* kolonisierten Körner festgestellt. Für die Bewertung der Kolonisierung der Körner durch Pathogene der Gattung *Fusarium* wurde die Methodik nach AMELUNG (1996) verwendet. Der DON-Gehalt wurde chromatographisch bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Die in Zusammenarbeit von ÚKZÚZ und VÚRV in dreijährigen Versuchen erhaltenen Ergebnisse der Auswertung der Resistenz gegen Ährenfusariose sind in *Tabelle 1* enthalten. In den Versuchen mit einer künstlichen Inokulation durch *F. culmorum* wurde eine hohe Kontamination durch DON erreicht. Durchschnittlich bewegte sie sich von 24,4 mg/kg bis 128,5 mg/kg. Der durchschnittliche DON-Gehalt war unter den Bedingungen einer natürlichen Infektion bei den gleichen Sorten wesentlich niedriger mit einer Spanne von 1,3 bis 8 mg/kg. Die Korrelationskoeffizienten zwischen den Merkmalen des Ährenbefalls und des DON-Gehalts, die in den beiden Versuchen (bei künstlicher und bei natürlicher Infektion) erhalten wurden, liegen in *Tabelle 2* vor. Es ist offensichtlich, dass die Korrelation zwischen dem Ährenbefall und dem DON-Gehalt bei beiden Infektionsformen statistisch bedeutend war. Eine statistisch bedeutende Korrelation wurde auch zwischen dem DON-Gehalt nach natürlicher und künstlicher Infektion und zwischen dem Ährenbefall bei beiden Infektionstypen festgestellt (auch wenn diese Korrelationen verhältnismäßig weniger eng waren). Statistisch unbedeutend war lediglich die Korrelation zwischen dem Ährenbefall nach der natürlichen Infektion und dem DON-Gehalt nach der künstlichen Infektion. Das Merkmal des Ährenbefalls nach künstlicher Infektion korrelierte jedoch in beiden Versuchstypen mit dem DON-Gehalt nach künstlicher Infektion. Das höchste Resistenzniveau wurde in beiden Versuchstypen übereinstimmend bei den Sorten Alana, Simila, Samanta und Apache festgestellt. Der höchste DON-Gehalt wurde in beiden angewandten Methoden bei der Sorte Mladka bestimmt. Auch die Sorten Complet, Florett, Biscay und Heroldo erwiesen sich in beiden Ver-

Tabelle 2: Korrelation unter Parameter bestimmten mit zwei verschiedenen Formen der Infektion

	FHB-N	FHB-A	DON-N
FHB-A	0,36 *	-	
DON-N	0,64 **	0,68 **	-
DON-A	0,08	0,68 **	0,47 **

* P < 0,05 ** P < 0,01

Tabelle 3: Zusammenfassung der Resistenzdaten der untersuchten Sorten nach künstlicher Infektion mit *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* in Kroměříž in Jahren 2005–2007. Die Ergebnisse aller drei untersuchten Parametr wurden dargestellt: % von Ährensymptome (% ÄS), % von Fusariumkolonisierten Körner (% KK), DON Gehalt (mg/kg)

Sorte	% ÄS	% KK	DON	Sorte	% ÄS	% KK	DON
Alana	2,52	5,67	0,46	Batis	1,95	6,67	1,68
Sarka	3,10	5,67	0,61	Contra	7,09	10,33	1,72
Acteur	2,05	11,67	0,71	Ludwig	2,74	4,33	1,74
Nella	2,19	3,33	0,72	Sulamit	5,48	12,00	2,28
Rheia	3,16	9,67	0,77	Bill	9,19	13,67	2,45
Drifter	3,63	14,33	1,31	Trend	3,97	11,67	2,53
Corsaire	3,86	19,67	1,35	Ebi	1,86	9,00	2,58
Samanta	4,23	2,00	1,45	Complet	5,79	22,33	3,51
Banquet	5,85	13,00	1,49	Vlasta	7,98	19,33	3,88
Saskia	4,43	8,00	1,51	Clever	10,35	20,67	4,07
Darwin	5,10	9,67	1,55	Mladka	10,85	26,33	5,79

suchstypen als anfällig. Unter den verfolgten Sorten gab es jedoch auch solche, die einen niedrigen DON-Gehalt in den Versuchen mit natürlicher Infektion und einen relativ hohen DON-Gehalt in den Versuchen mit künstlicher Infektion aufwiesen (Batis, Akteur). Dieser Umstand kann teilweise dadurch erklärt werden, dass in den Versuchen mit einer natürlichen Infektion auch Mechanismen der passiven Resistenz wirken können (Pflanzenhöhe), die die Pflanze vor dem Befall schützt. Umgekehrt wurde bei den Sorten Rheia, Banquet und Rapsodia in den Versuchen mit künstlicher Infektion ein relativ niedriger DON-Gehalt im Vergleich mit den Bedingungen der natürlichen Infektion festgestellt. Es erscheint, dass die natürliche Infektion offensichtlich die Resistenz des Typs I gegen den Befall berücksichtigt. Die künstliche Infektion individueller Ähren in einer genauen Phase berücksichtigt neben der Resistenz des Typs I auch die Resistenz des Typs II, was sich offensichtlich auch in der Resistenz gegen die Akkumulation von DON zeigt.

Die 22 Sorten, die in Kroměříž flächendeckend durch Besprühen infiziert wurden, umfassten ebenfalls 12 Sorten, die von VÚRV und ÚKZÚZ geprüft wurden. Der durchschnittliche DON-Gehalt bewegte sich bei diesen Sorten im Bereich 0,64–5,79 mg/kg. Der höchste DON-Gehalt wurde bei den Sorten Mladka, Clever, Vlasta und Complet festgestellt (Tabelle 3). Den niedrigsten Inhalt des Mykotoxins DON wurde bei den Sorten Alana, Rheia, Acteur, Šárka und Nela gefunden. Die Korrelation zwischen den einzelnen begutachteten Merkmalen enthält Tabelle 4. In allen Jahrgängen wurde eine statistisch bedeutende Korrelation zwischen dem DON-Gehalt im Korn und dem Ährenbefall wie auch zwischen dem DON-Gehalt und der Kolonisierung des Kornes durch Fusarien nachgewiesen. Dieser Typ der Infektion der ganzen Fläche berücksichtigt wahrscheinlich die Komponenten der Resistenz I und II.

Ein Vorteil der Versuche mit künstlicher Infektion ist die Möglichkeit, hohe Werte des DON-Gehalts zu erreichen,

Tabelle 4: Korrelationskoeffizienten zwischen untersuchten Parametern

	DON-Gehalt	Kolonisierte Körner
DON-Gehalt	-	0,5506**
Ährenbefall	0,6721**	0,4686**

** P < 0,01

wodurch die Sorten besser unterschieden werden können. Diese Methode ist ebenfalls bei verschiedenem Wetterverlauf erfolgreich (TOMASEVIC et al. 2005), besonders, wenn sie durch Bewässerung unterstützt wird. Die Methode, die die Infektion ausgewählter Ähren in der gleichen Phase der Blüte verwendet, ist am genauesten. Ein Nachteil ist die relativ kleine Menge von Körnern, die für weitere Analysen zur Verfügung steht. Das Besprühen der gesamten Fläche mit einer Infektionslösung, das in den Feldversuchen in Kroměříž angewandt wurde, ermöglicht es, eine große Menge an Körnern für weitere Analysen zu erlangen. Wenn der Versuch nicht durch Bewässerung unterstützt wird, so ist der DON-Gehalt in diesem Versuchstyp niedriger. Die Ergebnisse der letzten Jahre zeigten jedoch auch die Wichtigkeit der Auswahl von geeigneten Isolaten für die Versuche mit einer künstlichen Infektion (ŠÍP et al. 2008). Für den Nachweis der Unterschiede im Resistenzgrad der Sorten (in einem kürzeren Zeitintervall) erwies sich die Verwendung von mehreren Isolaten (*4-F. graminearum*) nach einer Auswahl auf der Grundlage der vorgeschlagenen Charakteristiken als nützlich.

Die Nutzung der natürlichen Infektion in Provokationsbedingungen (Vorfrucht Mais, Minimalbodenbearbeitung) für die Bewertung der Resistenz der Sorten ist weniger arbeitsaufwendig und entspricht mehr den Bedingungen in der landwirtschaftlichen Praxis. Hier können sich die Mechanismen der passiven Resistenz besser geltend machen. Ohne eine Unterstützung durch Bewässerung muss sich die Krankheit jedoch in trockenen Jahren nicht ausreichend entwickeln. Diese Methode erscheint als geeignet für das Screening von Material mit einer höheren Resistenz in der Züchtung.

Es kann festgestellt werden, dass die Sorten mit der höchsten Anfälligkeit gegenüber der Ährenfusariose und mit einer hohen Akkumulation von DON (Mladka, Complet) in den 3 Versuchstypen mit verschiedenen Infektionsquellen übereinstimmend erkannt wurden. Übereinstimmend war ebenfalls die höchste festgestellte Resistenz bei der Sorte Alana. Auch die Resistenz der Sorte Simila, die wie die Sorte Alana eine relativ hohe Resistenz bei den Versuchen von VÚRV und ÚKZÚZ aufwies, wurde in den bislang einjährigen Versuchen bei VÚZ Kroměříž bestätigt (persönliche Mitteilung VÁŇOVÁ 2008). Die höhere Resistenz der älteren Sorten Nela und Šárka, die in den Versuchen mit flächendeckender Infizierung nachgewiesen wurde, wurde

bereits früher in verschiedenen Versuchstypen erkannt (ŠÍP et al. 2007).

Der Schutz gegen Ährenfusariose erfordert ein komplexes Herangehen. Am wirksamsten erscheint die Kombination der Züchtung von Sorten mit höherer Resistenz mit einem gezielten Fungizidschutz. Der Resistenz der Sorten gegen Ährenfusariose wird in der Tschechischen Republik eine angemessene Aufmerksamkeit gewidmet, und dies sowohl bei der Züchtung als auch bei der Registrierung und Empfehlung von Sorten. Es wurden die folgenden Sorten tschechischer Herkunft mit einer höheren Resistenz gegen Ährenfusariose neu registriert: Simila (2006), Sakura (2007), Bakfis und Baletka (2008). Alle diese Sorten entstanden durch Kreuzung von kommerziell genutzten Winterweizensorten. Bei der Züchtung werden auch entferntere Resistenzquellen wie Sumai 3 u.a. verwendet. Als perspektiv erscheint bei der Nutzung dieser Quellen die Marker-gestützte Züchtung.

Bei der Bewertung der Resistenz in Feldbedingungen bleibt im Züchtungsprozess das Besprühen in die Ähren die Grundmethode. Fortgeschrittene Züchtungsmaterialien werden ebenfalls auf einem Standort mit einem alljährlichen starken Auftreten von Ährenfusariose hervorrufenden Pathogenen geprüft.

Zusammenfassung

Aus dem Gesichtspunkt einer sicheren Erlangung von Ergebnissen und einer Unterscheidung der geprüften Materialien erscheint die Inokulation durch Besprühen der Ähren am verlässlichsten, insbesondere wenn sie durch künstliche Bewässerung unterstützt wird. Die Methode der natürlichen Infektion, die die Vorfrucht Mais und eine Minimalbodenbearbeitung nutzt, imitiert den natürlichen Infektionsweg am besten. Die Methode ist jedoch stark vom Wetterverlauf im jeweiligen Jahr abhängig. Es erscheint wünschenswert, daß Ergebnisse vorliegen, die mit mehreren Methoden gewonnen wurden. Die Ergebnisse der Bewertung der Sorten dokumentieren die Möglichkeit, einen höheren Resistenzgrad auch unter Verwendung der derzeitigen kommerziellen Sorten als Eltern zu erzielen.

Danksagung

Die durchgeführten Arbeiten sind Teil der Forschungsprojekte MZE 0002700602 und NAZV QG50041 die von dem

Landwirtschaftsministerium der Tschechischen Republik unterstützt wurden. Dank gilt auch den Mitarbeitern der Landwirtschaftlichen Zentralanstalt für Kontrolle und Prüfung für die Ergebnisse der Feldversuche.

Literatur

- AMELUNG, D., 1996: Experience with the isolation of plant pathogenic fungi: In: Dahne et al. (eds): Proc. 4th Int. Symp. EFPP Diagnostic and Identification of Plant Pathogens. 9-12 Sept. 1996, Bonn, Germany: 35-36.
- BÜRSTMAYER, H., M. LEMMENS, M.L. DOLDI, M. STIERSCHNEIDER, B. STEINER, K. WERNER, L. HARTL und P. RÜCKENBAUER, 1999: Resistenzzüchtung bei Weizen gegenüber Ährenfusariosen. Bericht über die 50. Arbeitstagung der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter, BAL Gumpenstein, 23.-25. Nov. 1999, 63-68.
- CHRPOVÁ, J., V. ŠÍP, E. MATĚJOVÁ und S. SÝKOROVÁ, 2007: Resistance of winter wheat varieties registered in the Czech Republic to mycotoxin accumulation in grain following inoculation with *Fusarium culmorum*. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 43: 44-52.
- ITTU, M., N.N. SAULESCU, G. ITTU und M. MOLDOVAN, 2002: Approaches in breeding wheat for resistance to FHB in Romania. Petria, 12: 67-72.
- MESTERHÁZY, A., B. TÓTH, T. BARTÓK und M. VARGA, 2008: Breeding strategies against FHB in winter wheat their relation to type I resistance. Cereal Research Communications 36, Suppl.B: 37-43.
- NICHOLSON, P., N. GOSMAN, R. DRAEGER, M. THOMSETT, E. CHANDLER und A. STEED, 2007: The *Fusarium* head blight pathosystem. In: BUCK H.T., NISI J.E., SALOMÓN N. (eds.): Wheat Production in stressed Environments, Springer 2007, 12: 23-36.
- SCHROEDER, H. W. und J.J. CHRISTENSEN, 1963: Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. Phytopathology 53: 831-838.
- ŠÍP, V., J. CHRPOVÁ, L. LEIŠOVÁ, S. SÝKOROVÁ, L. KUČERA und J. OVESNÁ, 2007: Effects of genotype, environment and fungicide treatment on development of *Fusarium* head blight and accumulation of DON in winter wheat grain. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 43: 16-31.
- ŠÍP, V., J. CHRPOVÁ und S. SÝKOROVÁ, 2008: Assessing resistance to head blight in wheat cultivars inoculated with different *Fusarium* isolates. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 44: 43-59.
- TOMASEVIC, S., B. PALAVERŠIC und I. IKIC, 2005: Study of wheat lines resistance to *Fusarium* head blight. Cereal Research Communications 33: 583-588.

Expressionsanalyse der Abwehrreaktion von Winterweizen gegenüber *Fusarium graminearum*

Manuela Diethelm^{1*}, Sabine Mikolajewski¹, Carola Wagner², Markus Rhiel²,
 Lorenz Hartl¹, Wolfgang Friedt² und Günther Schweizer¹

Abstract

Fusarium head blight (FHB) in wheat, mainly caused by *Fusarium graminearum* is responsible for severe yield and quality losses. QTLs for FHB resistance have been identified in winter wheat populations but the underlying resistance genes are still largely unknown. The aim of this project funded by the DFG is to identify genes which are involved in the defence reaction of the chosen genotypes.

The parents of three winter wheat mapping populations were inoculated with *Fusarium graminearum*. The flower tissue was sampled during four days after inoculation and cDNA-AFLP analysis was conducted. About 100 differentially expressed TDFs (transcript derived fragments) were cloned and sequenced. TDFs which show polymorphisms were integrated into existing QTL-maps. Real-time PCR for the most interesting TDFs, like those of PR-Genes, Genes involved in stress signalling or which map in QTL-Regions for *Fusarium* head blight resistance was performed to validate the cDNA-AFLP results. A „WIR1“-Gen and a lipid transfer protein for example show highly elevated *Fusarium*-induced expression levels in resistant compared to susceptible genotypes. A differentially expressed putative Cytochrome P450 Monooxygenase maps into the interval of a QTL for FHB resistance.

Keywords:

Fusarium Head Blight, Winter Wheat, Expression Analysis, cDNA-AFLP, Candidate Genes

Einleitung

Fusarium-Taubähigkeit im Weizen wird vornehmlich von den Erregern *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* ausgelöst und führt zu starken Ertrags und Qualitätseinbußen, insbesondere durch eine hohe Mycotoxinbelastung des Erntegutes. Die Resistenz gegen *Fusarium* ist im Winterweizen quantitativ ausgeprägt. Es ist weder eine vollständige Resistenz gegenüber dem Eindringen des Pilzes in die Pflanze (Typ1-Resistenz) noch gegenüber dem Ausbreiten in der Ähre (Typ2-Resistenz) bekannt. Umfassende QTL-Kartierungen für *Fusarium*-Resistenz konnten bereits in mehreren Kartierungspopulationen durchgeführt werden, die hierfür verantwortlichen Gene sind jedoch weitestgehend unbekannt.

Ziel des vorliegenden DFG-Projektes ist die Aufklärung der für die Resistenzreaktion des Winterweizens verantwortlichen Gene mit Hilfe der Expressionsanalyse, sowie deren Rückkartierung in bestehende Chromosomenkarten auf der Basis von Sequenzpolymorphismen.

Material und Methoden

Die Eltern der spaltenden Kartierungspopulationen Dream (res.) x Lynx (anf.), G16-92 (res.) x Hussar (anf.) und SVP2017 (res.) x Capo (anf.) wurden für die vorliegende Expressionsanalyse ausgewählt. In den ersten beiden Populationen waren QTLs für *Fusarium*-Resistenz auf den Chromosomen 1A und 2BL (G16-92 x Hussar) sowie 1B, 2BL, 6AL und 7BS (Dream x Lynx) kartiert worden (SCHMOLKE et al. 2004, 2005, 2008; HÄBERLE et al. 2007). Die Eltern der Population SVP2017 (res.) x Capo (anf.) wurde wegen der für Winterweizen guten Ausbreitungsresistenz von SVP2017 ausgewählt, jedoch liegt zu SVP x Capo noch keine Chromosomenkarte bzw. QTL-Kartierung vor.

Die induzierte Abwehrreaktion des Weizens wurde durch eine Inokulation während der Anthese durch das Eintropfen von 10µl einer *Fusarium graminearum* Makrokonidien-Suspension (Stamm: IFA65, 500 Konidien/Blüte) in die Blüte provoziert. Lemma, Palea und Rachis inokulierter Blüten wurden anschließend während eines Zeitraums von vier Tagen beprobt. Aus dem Blütengewebe wurde RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die Proben den Zeitpunkten entsprechend einer cDNA-AFLP-Analyse unterzogen (Enzymsysteme: Pst/Mse, Sse/Mse; jeweils 30 Primerkombinationen). Verglichen wurde jeweils die mit *Fusarium*-inokulierten Probe im resistenten und im anfälligen Elter mit der Wasser behandelte Kontrollvariante.

AFLP-Banden, die dabei unterschiedliche Expressionsmuster zeigten, wurden aus dem Gel ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. Diese cDNA-Fragmente, auch als TDF bezeichnet (transcript derived fragment), sind Kandidaten für mögliche Resistenzgene. Sie wurden auf genomischer Ebene in den Ausgangseltern resequenziert um Sequenzunterschiede für eine Markerentwicklung festzustellen. Polymorphe Genfragmente wurden in bestehende QTL-Karten rückkartiert. Die differentielle Expression ausgewählter TDFs wurde durch quantitative Real-time PCR über den Verlauf der 4 Beprobungstage hinweg bestätigt (siehe *Abbildung 2* und *3*). Zur Berechnung der relativen

¹ Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 2 und 6, D-85354 FREISING

² Justus-Liebig-Universität Giessen, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 GIESSEN

* Ansprechpartner: Dipl.-Ing. Manuela DIETHELM, manuela.diethelm@lfl.bayern.de

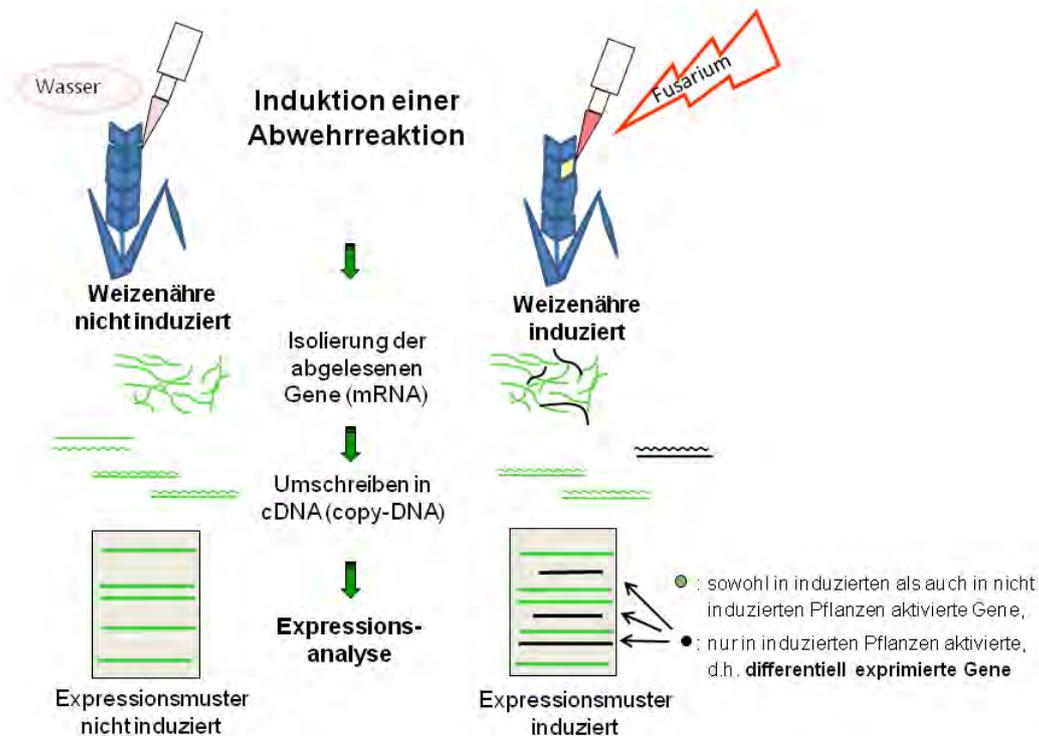


Abbildung 1: Übersicht über den Ansatz der Expressionsanalyse

Expression wurde die vergleichende delta delta Ct Methode angewendet. Als interner Standard diente ein konstitutiv exprimiertes Ubiquitin-Gen.

Ergebnisse und Diskussion

Die differentielle Genexpression im Vergleich von *Fusarium*-induziert mit Wasserkontrolle unter Anwendung der cDNA-AFLP Technik führte zu ca. 100 differentiiell exprimierten Genfragmenten. BLAST-Analysen in NCBI- und Tigr-Datenbanken ermöglichten einen Rückschluss auf die mögliche Funktion der gefundenen Gene über Sequenzvergleiche mit dort hinterlegten cDNA-Sequenzen. Hierbei konnte die Hälfte der differenziell exprimierten TDFs bekannten Genen mit bekannter Funktion zugeordnet werden, ein Drittel hat unbekannte Funktion. Der Rest zeigte Übereinstimmungen mit Sequenzen vom Pathogen *Fusarium graminearum*.

Ein differentiiell exprimiertes TDF mit großer Ähnlichkeit zu einem bereits bekannten „WIR1“-Gen des Weizens (wheat induced resistance gene 1) konnte auf Chromosom 5D der G16-92 x Hussar Population rückkartiert werden. „WIR1“-Proteine sind kleine membrandurchspannende Proteine anhand deren Struktur angenommen wird, dass sie zur Verstärkung der Adhäsion der Zellmembran an die Zellwand und damit zur höheren Stabilität der Zellmembran bei Pathogenangriff beitragen (BULL et al. 1992). „WIR1“-Gene wurden auch in anderen Interaktionen von Weizen mit *Fusarium* als hochreguliert identifiziert. Die Ergebnisse der quantitativen PCR zeigen (Abbildung 2), dass dieses „WIR1“-Gen nach *Fusarium graminearum* Infektion zwar im anfälligen Elter Hussar, wie auch im resistenten Elter G16-92, hochreguliert wird, jedoch in letzterem wesentlich

höher. Insbesondere zu den späteren Zeitpunkten 72 und 96 Stunden nach Inokulation ist das Gen in G16-92 ca. 30 und 50 mal höher exprimiert als in nicht-infizierten Kontrollen. Diese Zeitpunkte sind besonders bedeutsam für die Resistenzreaktion der Pflanze, da hier der Pilz versucht in die Ährenspindel einzudringen, um sich dann in der Ähre auszubreiten. Da dieses „WIR1“-Gen in kein bislang bekanntes QTL-Intervall für *Fusarium*-Resistenz kartiert, aber trotzdem extreme Expressionsunterschiede zwischen anfälligen und resistenten Genotypen zeigt, wird angenommen, dass es am Ende einer Abwehrkaskade steht, die in anfälligen Weizenpflanzen weit weniger stark ausgelöst wird oder vom Pilz gar unterbunden wird.

Ein weiteres interessantes TDF mit starken Expressionsunterschieden nach *Fusarium*-Inokulation zeigt große Ähnlichkeit zu einem „Lipid Transfer Protein“. Für Proteine

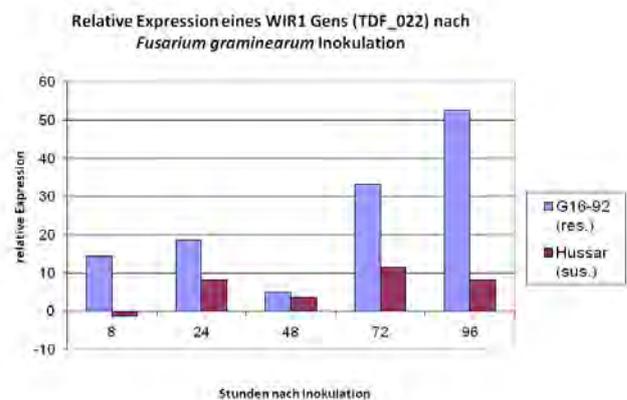


Abbildung 2: Differentielle Expression eines „WIR1“-Gens quantifiziert durch Real-time PCR nach *Fusarium*-Inokulation

aus der Familie der Lipid Transfer- Proteine wurde häufig eine Wirkung in der Abwehr gegenüber Pathogenen gezeigt. Einzelnen Proteinen wurde eine direkte Wirkung gegen Pilze, eine Rolle in der Verstärkung von mechanischen Barrieren oder eine Aufgabe in der Signaltransduktion während der Pathogenabwehr nachgewiesen. Real-time PCR zeigte, dass dieses TDF sowohl in nicht infizierten Kontrollproben, wie auch zu fast allen Zeitpunkten nach *Fusarium*-Inokulation nur im resistenten Elter G16-92 exprimiert wird. Nur 72 Stunden nach Inokulation war das Gen auch im anfälligen Hussar aktiv. In G16-92 wird dieses Gen besonders nach 72 und 96 Stunden stark hochreguliert. Über eine Kartierung mit Hilfe von Nullitetrasonen Linien von Chinese Spring konnte es physikalisch dem Chromosom 4A zugeordnet werden. Interessanterweise befinden sich auf diesem Chromosom auch ein QTL für *Fusarium*-Resistenz aus Winterweizen (z.B. von Arina).

Bemerkenswert ist ein weiteres TDF mit Ähnlichkeit zu einer „Cytochrom P450 Monooxygenase“. Es kartierte in ein 95% QTL-Vertrauensintervall für *Fusarium*-Resistenz auf Chromosom 2B der History x Rubens Population (Karte von HOLZAPFEL et al. 2008). Cytochrom P450-Monooxygenasen übernehmen weitgefächerte Aufgaben in der Zelle, unter anderem die Synthese von pflanzeigenen Abwehrstoffen und Entgiftung von toxischen Substanzen. In Ergebnissen der Real-time PCR viel auf, dass dieses TDF im resistenten Genotyp SVP nur nach acht Stunden stark exprimiert wird und zu den späteren Zeitpunkten nach unten reguliert wird. Im anfälligeren Capo hingegen wird das Gen zu allen Zeitpunkten leicht hochreguliert und erreicht das Maximum erst 72 Stunden nach Inokulation, also wesentlich später als in SVP.

Im Folgenden konnten zwei differentiell exprimierte Genfragmente mit unbekannter Funktion aus dem resistenten Genotyp SVP gefunden werden, sie kartierten in Genombereiche, in denen bereits bekannte QTL in der Literatur beschrieben wurden. Ein TDF, das in der cDNA-AFLP Analyse in sehr frühen Probenahmezeitpunkten erscheint, konnte auf Chromosom 5A in die Nähe des Microsatelliten xgwm 639 kartiert werden, wo sich in der Population Renan

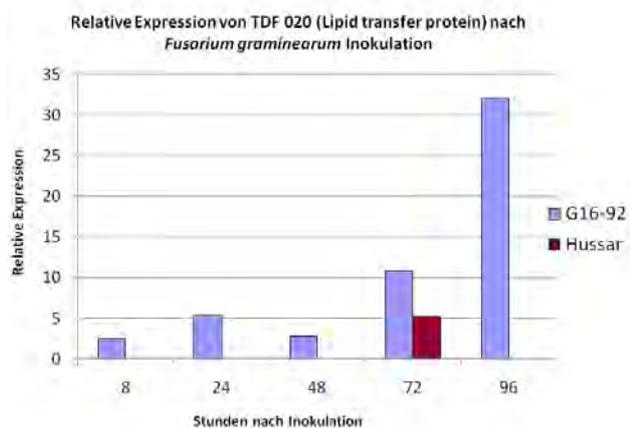


Abbildung 3: Differentielle Expression eines „Lipid transfer Proteins“ quantifiziert durch Real-time PCR nach *Fusarium*-Inokulation

x Recital (GERVAIS et al. 2003) ein QTL für *Fusarium*-Resistenz sowie für Wuchshöhe befindet. Ein weiteres TDF, das 72 und 96 Stunden nach Inokulation exprimiert wird, liegt in der unmittelbaren Nähe zum Microsatelliten xgwm 368 auf Chromosom 4B, auch hier wurde bereits ein QTL für *Fusarium*-Resistenz in Wangshuibai (JIA et al. 2005) beschrieben. Weitere Analysen stehen im laufenden DFG-Projekt noch an.

Zusammenfassung

Zwischen anfälligen und resistenten Eltern von für *Fusarium*-Resistenz spaltenden Kartierungspopulationen konnten, trotz der quantitativen Ausprägung der Resistenz starke Unterschiede in der Genexpression bei den vorgestellten Kandidatengen gefunden werden. Die bislang analysierten TDFs stammen wie „WIR1“ und das „Lipid Transfer Protein“ aus Genfamilien, die deutlich in der Abwehr- und Stressantwort von Pflanzen involviert sind.

Auch konnten bereits einige der differentiell exprimierte Genfragmente in Genombereiche kartiert werden, in denen QTL für *Fusarium*-Resistenz nachgewiesen werden konnten. Weitere TDFs stehen noch zur eingehenden Analyse und Markerentwicklung an.

Die differentielle Genexpression in Kombination mit der cDNA-AFLP Analyse ist damit eine Methode, die es erlaubt potentielle Kandidatengene für die Resistenzzüchtung auffindig zu machen. Neuere Hochdurchsatz-Techniken können diesen Weg noch deutlich beschleunigen. Eine Verifikation mit Felddaten ist jedoch immer eine essentielle Vorgabe.

Literatur

- BULL, J., F. MAUCH, C. HERTIG, G. REBMANN and R. DUDLER, 1992: Sequence and expression of a wheat gene that encodes a novel protein associated with pathogen defense. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 5: 516-519.
- GERVAIS, L., F. DEDRYER, J.-Y. MORLAIS, V. BODUSSEAU, S. NEGRE, M. BILOUS, C. GROOS and M. TROTTELET, 2002: Mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in an european winter wheat. *Theor Appl Genet*. 106: 961-970.
- HÄBERLE, J., M. SCHMOLKE, G. SCHWEIZER, V. KORZUM, E. EBMEYER, G. ZIMMERMANN and L. HARTL, 2007: Effects of Two Major *Fusarium* Head Blight Resistance QTL Verified in a Winter Wheat Backcross Population, *Crop Science* 47: 1823-1831.
- HOLZAPFEL, S., H.-H. VOSS, T. MIEDANER, V. KORZUM, J. HÄBERLE, G. SCHWEIZER, V. MOHLER, G. ZIMMERMANN and L. HARTL, 2008: Inheritance of resistance to *Fusarium* head blight in three european winter wheat populations. *Theor Appl Genet*. 117, 1119-1128.
- JIA, G., P. CHEN, G. QIN, G. BAI, X. WANG, S. WAN, B. ZHOU, S. ZHANG and D. LIU, 2005: QTLs for *Fusarium* head blight response in a wheat DH population of Wangshuibai/Alondra's. *Euphytica* 146:183-191.
- SCHMOLKE, M., 2004: Molekulargenetische Charakterisierung und Lokalisierung von Resistenzgenloci gegen Ährenfusariosen in Winterweizen. Dissertation TU-München.

SCHMOLKE, M., G. ZIMMERMANN, H. BUERSTMAYR, G. SCHWEIZER, T. MIEDANER, V. KORZUN, E. EBMEYER and L. HARTL, 2005: Molecular mapping of *Fusarium* head blight resistance in the winter wheat population Dream/Lynx. *Theor Appl Genet*, Vol.111: 747-756.

SCHMOLKE, M., G. ZIMMERMANN, G. SCHWEIZER, T. MIEDANER, V. KORZUN, E. EBMEYER and L. HARTL, 2008: Molecular mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in a european winter wheat population. *Plant Breeding*, 127, 459-464.

Die Entwicklung einer quantitativen PCR Methode zur Beurteilung der *Fusarium*-Resistenz von Weizen

Kurt Brunner^{1*}, Maria Paula Kovalsky Paris, Guadalupe Paolino, Hermann Bürstmayr, Marc Lemmens, Franz Berthiller, Rainer Schuhmacher, Rudolf Krska und Robert L. Mache

Abstract

The breeding of *Fusarium* tolerant wheat is one of the major efforts of plant breeders nowadays. Usually artificial inoculation is chosen to infect the new breeds and visual ratings or mycotoxin analyses are applied to acquire knowledge of plant resistance. We developed a quantitative PCR Method which allows fast and reliable assessment of disease resistance. In contrast to previous PCR techniques a reference system was used to compensate for unsteadiness of DNA isolation and sample preparation procedure. The results obtained by the newly developed technique were in perfect accordance with the toxin-method but provided in several cases different results than visual ratings.

Key words: *Fusarium*, plant resistance determination, quantitative PCR

Der pflanzenpathogene Pilz *Fusarium* befällt Getreide und Mais und verursacht dadurch erhebliche Ertragseinbußen. Vermindertes Korngewicht und vor allem die Belastung des Korns mit toxischen Substanzen (Mycotoxinen) reduzieren die Qualität drastisch. Die Infektionen durch *Fusarium* werden durch feuchte Witterung, reduzierte Bodenbearbeitung und durch ungünstige Fruchtfolgen (Weizen auf Mais) begünstigt. Obwohl die Resistenzzüchtung von Weizen im Laufe des letzten Jahrzehntes bedeutende Fortschritte gemacht hat, sind hochresistente Sorten noch nicht am Markt erhältlich. Die Bewertung der *Fusarium* Resistenz von neuen Sorten erfolgt meist durch künstliche Infektion mittels Sprayinokulation oder über den natürlichen Infektionsweg unter erhöhtem Infektionsdruck durch das Ausbringen von Maisstoppeln oder befallenen Maiskörnern. Die Bestimmung des Befallsgrades erfolgt meist durch visuelle Bonitur und oft auch über die analytische Bestimmung des Mycotoxingehaltes im geernteten Korn. Beide Verfahren sind sehr zeitaufwändig und eine vollständige Analyse des Mycotoxingehaltes sehr kostenintensiv. Um Kosten für die Toxinbestimmung zu sparen wird meist nur Deoxynivalenol (DON) gemessen und als Leittoxin betrachtet. Seit einigen Jahren ist aber bekannt, dass Pflanzen die Mycotoxine als Glucoside maskieren (BERTHILLER et al. 2005) und dadurch an den etablierten Analysemethoden vorbeischießen können. Es wird vermutet, dass die Entgiftung durch Maskierung ein wesentlicher Mechanismus für erhöhte Resistenz von Pflanzen gegen *Fusarium* ist. Da aber die

Glucose im Magen-Darmtrakt von Säugetieren wieder abgespalten wird, kommt die akute Toxizität des DON wieder voll zur Geltung.

Einen neuen Ansatz zur Bestimmung des Befallsgrades in einer Pflanze oder in geerntetem Korn bietet die quantitative PCR (SCHNERR et al. 2001, REISCHER et al. 2004, WAALWIJK et al. 2004, YLI-MATTILA et al. 2008). Mit Hilfe der PCR wird die Menge an *Fusarium* DNA in einer Probe bestimmt. Diese Methode ist einerseits sehr sensitiv und Infektionen können bereits festgestellt werden bevor Symptome sichtbar sind und andererseits ist die Messung sehr selektiv. Der Befall mit anderen Pathogenen wird durch die *Fusarium*-PCR bewusst nicht erfasst. Diese Technik erlaubt einen sehr hohen Probendurchsatz und ist daher sehr kostengünstig. Damit die Aussagen über den *Fusarium*befall jedoch ausreichend zuverlässig werden, ist eine aufwändige Optimierung der gesamten Analyseprozedur unerlässlich. An der Technischen Universität Wien wurde eine Methode entwickelt, die künftig schnelle und kostengünstige PCR basierte Analytik der *Fusarium*menge in Proben erlaubt.

Übersicht: Die Stärken der quantitativen PCR

- Die PCR (Polymerase Kettenreaktion) weist einen Organismus anhand seiner DNA nach
- Die PCR ist sehr sensitiv, wenige Moleküle *Fusarium* DNA reichen für einen positiven Test
- Die PCR ist sehr selektiv; es wird nur ein bestimmter Organismus nachgewiesen, selbst wenn andere, ähnliche in einer Probe zu finden sind
- Die PCR ist sehr schnell und kostengünstig

Die Probenvorbereitung

Die Isolation von DNA aus einer Probe stellt einen Schlüsselprozess für die gesamte folgende Analyse dar. Um die Ausbeute an DNA zu maximieren wurden verschiedene Zerkleinerungsverfahren (Mühle, Ultraschall und flüssiger Stickstoff), verschiedene Puffersysteme und verschiedene Reinigungsschritte auf deren Tauglichkeit getestet und mit kommerziell erhältlichen DNA-Isolationskits verglichen.

Es zeigte sich, dass eine modifizierte Methode der Europäischen Referenzlaboratorien (CRL) mit Abstand die meiste DNA aus Weizen zu isolieren vermochte. Zusätzlich zur sehr hohen Ausbeute ermöglicht diese Methode auch sehr gute Wiederholbarkeit der Aufschlüsse und sie ist sehr einfach handzuhaben.

¹ Technische Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Getreidemarkt 9, A-1060 WIEN

* Ansprechpartner: Dr. Kurt BRUNNER, brunner@mail.tuwien.ac.at

Entwicklung eines Referenzsystems

Der Vergleich von früheren Publikationen zum Thema *Fusarium* Messung mittels quantitativer PCR zeigte, dass oft kleine Unterschiede in der Probenvorbereitung zu drastischen Verfälschungen der Resultate führen. Daten aus unterschiedlichen Studien und unterschiedlichen Labors waren bisher kaum vergleichbar. Um diese Einschränkung der PCR Methode zu beseitigen wurde an der TU Wien ein Referenzsystem in Anlehnung an die etablierten PCR Nachweise für gentechnisch veränderten Mais entwickelt. Um Unregelmäßigkeiten in der Probenvorbereitung zu kompensieren, wird die *Fusarium* DNA Menge auf die gesamte extrahierte DNA bezogen und nicht wie in früheren Studien üblich, auf die eingesetzte Probenmenge.

Die Korrelation zwischen PCR Ergebnissen, Toxinmenge und visueller Bonitur

Um die Aussagekraft der PCR-Analytik für *Fusarium*befall in Weizen zu untersuchen, wurden 80 verschiedene Weizenproben mit unterschiedlichem Infektionsgrad mittels PCR vermessen. Unabhängig vom Jahr aus dem die Probe stammte und vom applizierten *Fusarium* Stamm zeigte sich eine äußerst gute Korrelation zwischen den Toxinwerten und der PCR Messung. Für die Toxinmenge wurde die Summe aus DON und DON-3-glukosid (maskiertes DON) herangezogen, da in einigen Proben mehr als 50% des DON maskiert vorlagen. Andere Toxine wie zum Beispiel Nivalenol wurden nur in vernachlässigbaren Mengen nachgewiesen.

Obwohl zu erwarten wäre, dass die Daten aus der visuellen Bonitur sehr gut mit dem PCR-bestimmten Infektionsgrad übereinstimmen sollten, wurde hier eine wesentlich schlechtere Korrelation beobachtet als zwischen Infektion und der Toxinmenge.

Die Resistenzbewertung von 20 Weizensorten

20 Weizensorten mit sehr hoher bis sehr niedriger Resistenz gegenüber *Fusarium* wurden 2005 mit *F. graminearum* und 2006 mit *F. culmorum* infiziert. Die Versuche wurden jeweils in zwei Parzellen am Feld durchgeführt. Um die drei Methoden visuelle Bonitur, Toxinmessungen und

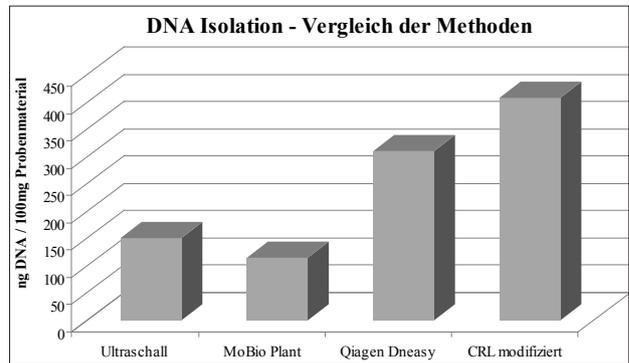


Abbildung 1: Vergleich der DNA Ausbeute einiger etablierter Isolationsmethoden

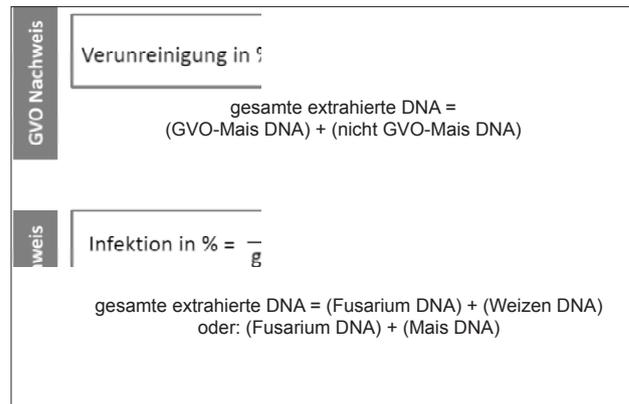


Abbildung 2: Umlegung der etablierten PCR-Methode zum Nachweis von gentechnisch verändertem Mais auf die Bestimmung der Infektion durch *Fusarium*

PCR-bestimmte Infektion vergleichen zu können wurden alle drei Methoden einander gegenübergestellt. In allen Fällen lieferten die Toxinwerte und die PCR-Methode idente Aussagen betreffend der Reihung der einzelnen Proben hinsichtlich Resistenz. Die Daten der visuelle Bonitur wichen besonders bei den resistenten Sorten oft deutlich von den beiden anderen Methoden ab.

Obwohl die Toxinanalytik und die PCR-Methode auf sehr unterschiedliche Weise die Resistenz von Weizen gegen *Fusarium* beurteilen, lieferten sie jedoch für *F. culmorum* und *F. graminearum* eine idente Reihung der Sorten hinsichtlich Resistenz. Es wäre zu erwarten, dass die visuell

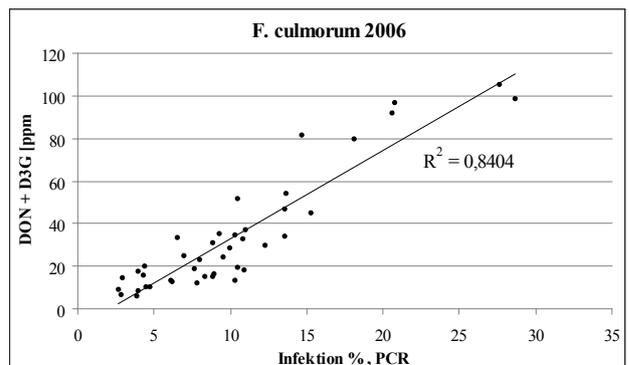
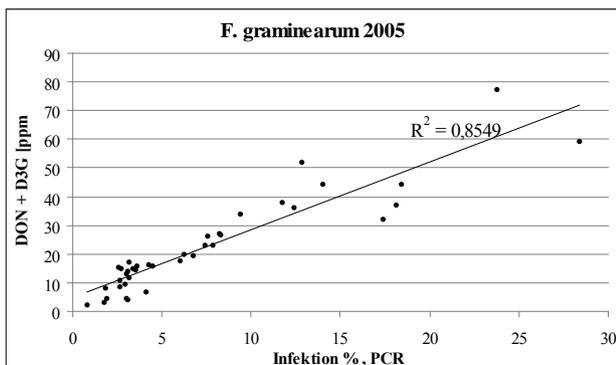


Abbildung 3: Die gebildete Toxinmenge korreliert unabhängig vom Jahr oder eingesetzten Stamm sehr gut mit der nachgewiesenen Menge an *Fusarium*

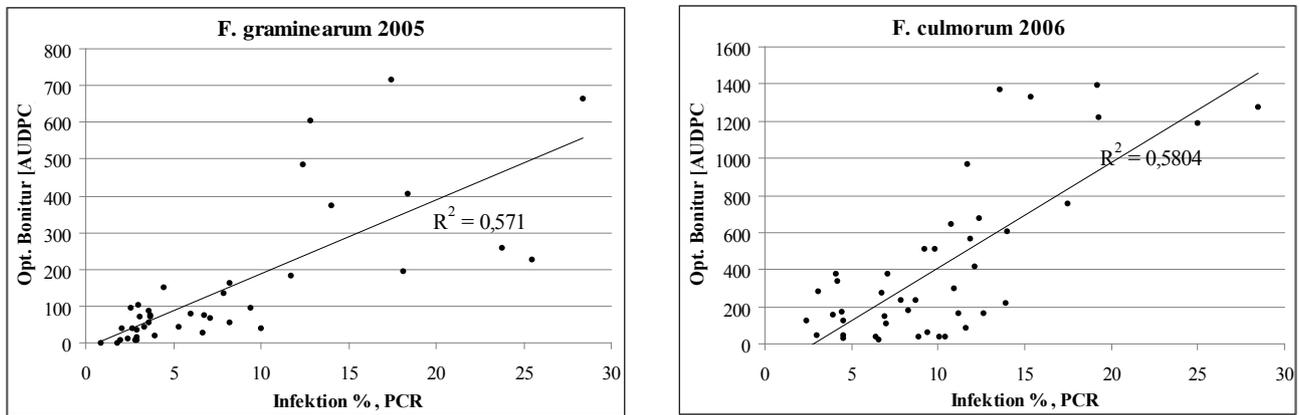


Abbildung 4: Korrelation zwischen visueller Bonitur (AUDPC - Area Under Disease Pressure Curve) und dem PCR bestimmten Infektionsgrad

beurteilten Symptome sowohl mit der Toxinmenge als auch mit der Menge des Pilzes sehr gut korrelieren sollten, dennoch lieferte diese Methode oft abweichende Ergebnisse, besonders bei eher resistenten Sorten.

Im Zuge dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung des Grades der Infektion mit *Fusarium* mittels quantitativer PCR sehr zuverlässige Ergebnisse liefert. Diese Methode erlaubt das Bearbeiten großer Probenmengen innerhalb sehr kurzer Zeit zu sehr geringen Kosten und stellt damit eine weitere Methode zur Resistenzbewertung neben den beiden etablierten dar.

Literatur

BERTHILLER, F., C. DALL'ASTA, R. SCHUHMACHER, M. LEMMENS, G. ADAM and R. KRŠKA, 2005: Masked Mycotoxins: Determination of a Deoxynivalenol Glucoside in Artificially and Naturally Contaminated Wheat by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3421-3425.

REISCHER, G.H., M. LEMMENS, A.H. FARNLEITNER, A. ADLER and R.L. MACH, 2004: Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan probe. *J. Microbiol. Meth.* 59: 141-146.

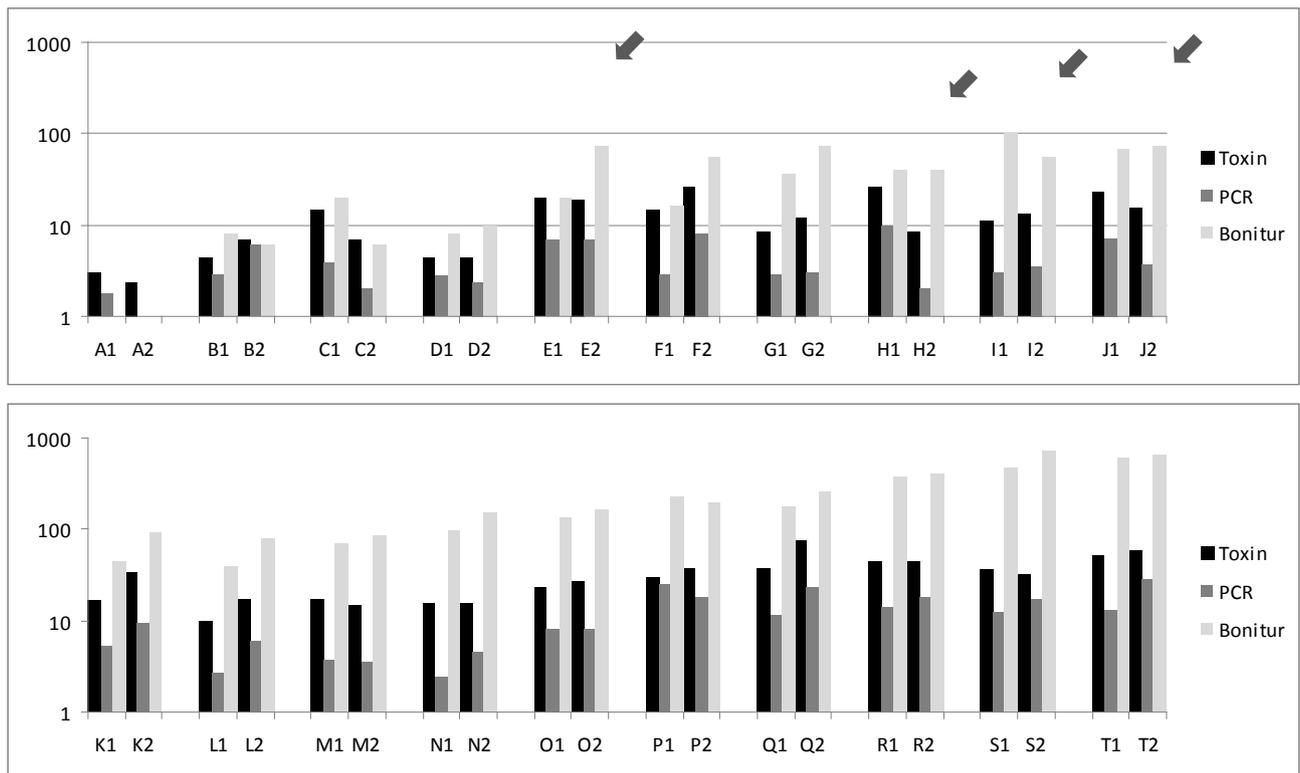


Abbildung 5: Inokulation mit *F. graminearum*. Die Buchstaben markieren die jeweiligen Sorten und ihre Feldwiederholung. A1: Parzelle 1 der Sorte A, A2: Parzelle 2 der Sorte A. Die Y-Achse gibt folgende Einheiten wieder: Toxinmenge [mg/kg], PCR-Methode [Infektions%] und visuelle Bonitur [AUDPC]. Die Pfeile markieren Feldwiederholungen mit deutlicher Abweichung der Boniturdaten von den beiden anderen Methoden.

- SCHNERR, H., L. NIESSEN and R.F. VOGEL, 2001: Real-time detection of the *trf5* gene in *Fusarium* by LightCycler-PCR using SYBR Green I for continuous fluorescence monitoring. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 53-61.
- WAALWIJK, C., R. VAN DER HEIDE, I. DE VRIES, T. VAN DER LEE, C. SCHOEN, G.C. CORAINVILLE, I. HÄUSLER-HAHN, P. KASTELEIN, J. KÖHL, P. LONNET, T. DEMARQUET and G.H.J. KEMA, 2004: Quantitative detection of *Fusarium* in wheat using TaqMan. *Europ. J. Plant Pathol.* 110: 481-494.
- YLI-MATTILA, T., S. PAAVANEN-HUHTALA, M. JESTOI, P. PARIKKA, V. HIETANIEME, T. GAGKAEVA, T. SARLIN, A. HAIKARA, S. LAAKSONEN and A. RIZZO, 2008: Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 41(4): 243-260.

Planung und Auswertung von Versuchen zur Bewertung der Resistenz von Getreidesortimenten

Eckard Moll¹*

Zusammenfassung

Mit Hilfe der SAS/AF-Anwendung RESI 2 kann der Nutzer ohne SAS-Kenntnisse einen einfaktoriellem randomisierten Versuchsplan erstellen. Bei mehr als 20 zu prüfenden Sorten bzw. Linien ist das eine Versuchsanlage in unvollständigen Blocks, eine Gitteranlage. Die als Ergebnis abgelegte MS-Excel-Datei kann gleich zur Erfassung der in bestimmten Zeitabständen beobachteten Befallswerte der einzelnen Parzellen genutzt werden. Das für die statistische Analyse verwendete Merkmal ist die Fläche unter der Befallsverlaufskurve für jede Parzelle. Analysiert wird sowohl der Einzelversuch als auch die Versuchsserie.

Zum Erlernen des Schätzens des prozentualen Befalls werden für einige Getreidekrankheiten aus einem Pool konstruierter Schadbilder wiederholt zufällig Schadbilder ausgewählt, für die der Befall zu schätzen ist.

Schlagwörter:

SAS/AF, Versuchsplan, Blockanlage, Gitteranlage, Einzelversuch, Versuchsserie, Schätzen des prozentualen Befalls, Getreidekrankheiten

Abstract

SAS/AF application RESI 2 helps to produce one-factorial randomised experimental designs without any knowledge of SAS. In case of more than 20 cultivars or lines to be tested, it will result in an incomplete block design, i. e. a lattice design. The design is exported as excel sheet, which can be used to enter infection data of the individual plots obtained at certain intervals of times. The character used for statistical analysis is the area under the disease progress curve per plot. Analysis comprises both individual experiments and series of experiments.

The application helps to learn how to estimate the percentage infection for certain cereal diseases. It offers drawings of symptom expression at a random order and the user estimates the percentage of infection. The drawings are chosen from a pool of constructed drawings.

Keywords:

SAS/AF, experimental design, block design, lattice design, individual experiment, series of experiments, estimation of percentage infection, cereal diseases

1 Einleitung

Auf der Grundlage der Software SAS 9 wird mit SAS/AF eine grafische Oberfläche für die Planung und Auswertung von Versuchen zur Bewertung der partiellen Resistenz von Getreidesortimenten entwickelt, mit deren Hilfe der Nutzer ohne Kenntnisse von SAS

- einen randomisierten Versuchsplan konstruieren,
- einen einzelnen Versuch oder eine Versuchsserie auswerten kann und
- Unterstützung beim Erlernen des Schätzens des prozentualen Befalls findet.

Dieser Leistungsumfang der SAS/AF-Anwendung RESI 2 ist im Vergleich zur Vorgängerversion unter SAS 6.12 wesentlich erweitert.

2 Konstruktion eines randomisierten Versuchsplans

Die Grunddatei, die die zu prüfenden Sorten oder Linien enthält, ist eine MS-Excel-Datei. Es dürfen nur die in *Tabelle 1* aufgeführten Spalten vorhanden sein. Weitere Informationen und Notizen sind auszuschließen. Die Nummer muss nicht eine laufende sein. Das Kennzeichen Kennz ist sor-

Tabelle 1: Struktur der Grunddatei mit dem Prüfsortiment

Nummer	Kennz	Anmelder	Sorte
1	7462	Saatzucht ABC	Alpha 8
2	7464	Saatzucht ABC	Alpha 8 c
3	7559	Saatzucht ABC	Beta
4	7467	Saatzucht ABC	Gamma
5	7469	Saatzucht XYZ	Delta
6	7571	Saatzucht XYZ	Klein Epsilon
7	7426	Saatzucht XYZ	Zeta
8	7428	Verband 11	Eta
9	7430	Verband 11	Theta
10	7432	Verband 11	Jota
11	7434	Verband 11	Kappa
12	7435	Verband 11	Lambda
13	7512	Pflanzenzucht	My
14	7518	Pflanzenzucht	Ny
15	7574	Pflanzenzucht	Xi
16	7582	Pflanzenzucht	Omikron

tenspezifisch. Die in *Tabelle 1* aufgeführten Informationen sind fiktiv und dienen nur der Anschauung. Sie sollen aber zeigen, dass verschiedene Formen von Anmelder- und Sortenbezeichnungen möglich sind.

¹ Julius Kühn-Institut, Bundesforschung für Kulturpflanzen, Zentrale Datenverarbeitung, Stahnsdorfer Damm 81, D-14532 KLEINMACHNOW

* Ansprechpartner: Dr. Eckard MOLL, eckard.moll@jki.bund.de

Weiterhin werden die Anzahl der Wiederholungen benötigt und als Information, welche Standards - resistenter, lokaler und/oder anfälliger Standard - im Versuchsplan zu berücksichtigen sind. Ein solcher Standard wird im Versuchsplan häufiger als die anderen Prüfglieder wiederholt.

Konstruiert wird eine Lageplan für eine einfaktorielle randomisierte Anlage in vollständigen Blocks für bis zu etwa 20 zu prüfende Sorten oder Linien, ab etwa 20 ein Lageplan für eine einfaktorielle randomisierte Anlage in unvollständigen Blocks (Alpha-Gitteranlage) und für um 20 zu prüfende Sorten oder Linien beide Lagepläne. Die Ergebnisse werden sowohl als Text-Datei als auch als MS-Excel-Datei ausgegeben.

3 Erfassen der Befallsdaten

Die Ausgabe des Lageplans als Spaltenform in einer MS-Excel-Datei macht es einfach, die Schätzwerte für den prozentualen Befall eines jeden Teilstücks zu erfassen. Der Befall soll in einigen Tagen Abstand wiederholt bonitiert werden, so dass diese Datei durch die Spalten Befall 1, Befall 2, Befall 3, ... mit den entsprechenden Befallswerten erweitert wird.

4 Versuchsauswertung

4.1 Das auszuwertende Merkmal

Das auszuwertende Merkmal ist die Fläche unter der Befallsverlaufskurve (Abbildung 1). Sie wird für jedes Teilstück berechnet und ist die Grundlage statistischer Analysen.

Der Mittelwert für jede Sorte ist die Basis dafür, eine Boniturnote, zu berechnen. Sie wird nicht statistisch ausgewertet. Allerdings muss mitgeteilt werden, ob eine logarithmische oder lineare Boniturskala zugrunde gelegt werden soll. Je nach dem wird als Vorschrift verwendet:

Boniturnote (WALTER u.a. 2000) =
 logarithmisch: $1 + \log_{1,65}(0.5433 * \text{Befall} + 0.60606)$
 linear: $1 + \text{Befall}/12,5$

Es ist möglich und empfehlenswert, für das auszuwertende Merkmal die Boxplots zeichnen zu lassen (Abbildung 2).

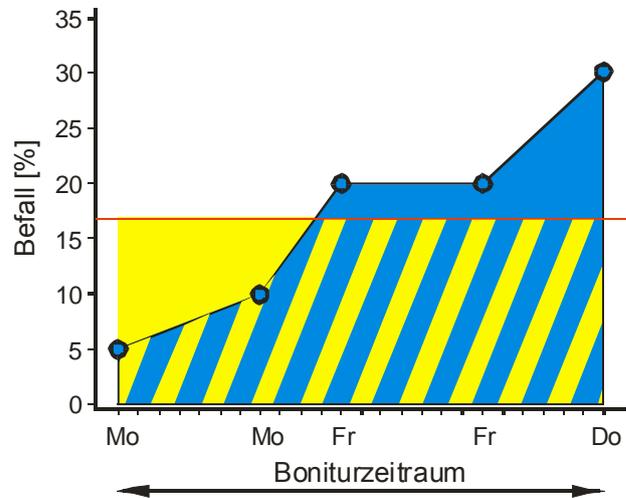


Abbildung 1: Fläche unter der Befallsverlaufskurve

4.2 Statistische Analyse

Der Vergleich der Sorteneffekte auf der Grundlage der Befallswerte wird mit Hilfe der Varianzanalyse und der multiplen Tukey-Prozedur vorgenommen. Wegen starker Unbalanziertheit, der Versuch ist mit häufiger wiederholten Standards (s.o.) bereits so geplant, ist die Tukey-Prozedur stark konservativ (SCHUMACHER und WEIMER 2006). Die Zulässigkeit der Durchführung der Tukey-Prozedur wird mit Hilfe eines SAS-Macros von SCHUMACHER und WEIMER (2006) und der dort realisierte Hayter-Bedingung entschieden. Sonst wird das Simulate-Verfahren eingesetzt. Damit wird unter Nutzung leistungsfähiger Rechentechnik die Verteilung der kritischen Quantile zur Einhaltung des versuchsbezogenen Signifikanzniveaus berechnet.

Für die Analyse einer Versuchsserie unter zusätzlicher Berücksichtigung der Orts- und Jahreseffekte wird als multiples Testverfahren das Simulate-Verfahren herangezogen.

5 Schadbilder

Hauptanliegen dieses Zweigs der SAS/AF-Anwendung RESI 2 ist es, die Qualität des Schätzens des prozentualen Befalls zu erhöhen. Das geht nur durch wiederholtes

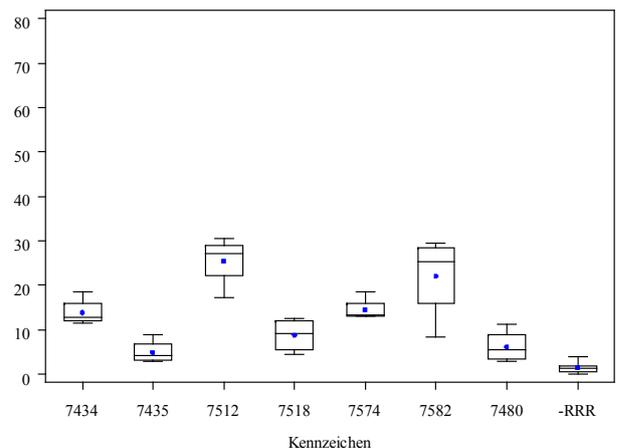
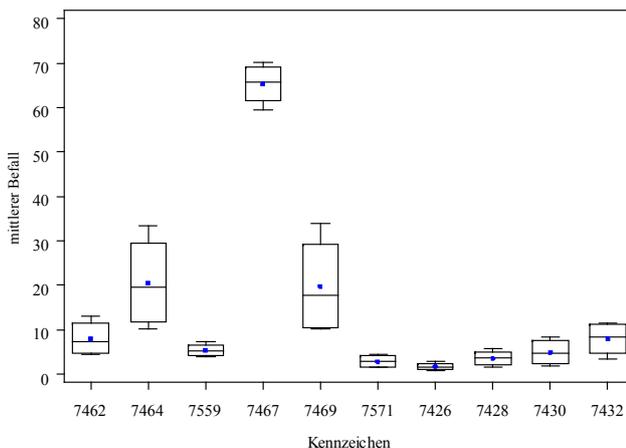


Abbildung 2: Boxplots für die Verteilung des Befalls

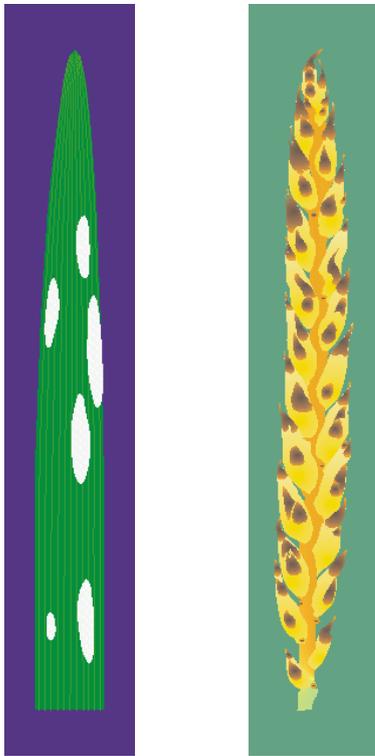


Abbildung 3: Schadbilder für Echter Mehltau der Gerste (l) Stagonospora-Spelzenbräune des Weizens (r)

Schätzen. Konstruierte Schadbilder im Bereich von 0,3 % bis 90 % Befall liegen für folgende pilzliche Krankheiten im Getreide vor:

- *Blumeria graminis* (DC.) E.O. Speer f. sp. *tritici* Em. Marchal (Echter Mehltau des Weizens)
- *Blumeria graminis* (DC.) E.O. Speer f. sp. *hordei* Em. Marchal (Echter Mehltau der Gerste)
- *Pyrenophora teres* Drechs. (Netzfleckenkrankheit der Gerste)
- *Septoria tritici* Roberge in Desmaz., *Stagonospora nodorum* (Berk.) Castell. & E.G. Germano (Septoria-Blattdürre des Weizens, Stagonospora-Blattbräune des Weizens)
- *Stagonospora nodorum* (Berk.) Castell. & E.G. Germano (Stagonospora-Spelzenbräune des Weizens)
- *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc., *Fusarium graminearum* Schwabe (Partielle Weißfährigkeit des Weizens)

- *Puccinia striiformis* Westend. (Gelbrost des Weizens)
- *Puccinia triticina* Eriks., *Puccinia hordei* Oth (Braunrost des Weizens, Zwergrost der Gerste)
- *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J. J. Davis (Rhynchosporium-Blattkrankheit der Gerste)
- *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (Pyrenophora-Blattdürre des Weizens)

Zwei solcher Schadbilder sind in *Abbildung 3* vorgestellt. Ihre Farbgebung erfolgte in Anlehnung an natürliche Schadbilder, was in schwarz-weiß nicht so zur Geltung kommt. Die Auswahl der Bilder erfolgt für jede der o.g. Krankheiten zufällig. Der Befall für die beiden ausgewählten Schadbilder beträgt für den Echten Mehltau der Gerste 13 % und für die Stagonospora-Spelzenbräune des Weizens 27 %.

Wenn wir den Befall nicht mehr anhand von Boniturnoten sondern durch den geschätzten prozentualen Befall einschätzen muss die Qualität des Schätzens erhöht werden. Um hierfür einen stärkeren Beitrag zu leisten, ist ausschließlich dieser Teil des Schätzens des prozentualen Befalls für o.g. Krankheiten unabhängig von SAS als eigenständige Webanwendung entwickelt worden. Man findet sie im Internetangebot des Julius Kühn-Instituts: www.jki.bund.de unter > Pflanzen schützen, > Krankheiten bestimmen, Quantitative Befallsschätzung von Getreidekrankheiten. Ein direkter Zugang über die URL <http://prozentualerbefall.jki.bund.de> ist auch möglich.

Die 66 der für jede Krankheit konstruierten Schadbilder erlauben es, in der SAS/AF-Anwendung einen möglichen Befallsverlauf darzustellen.

Literatur

- SCHUMACHER, E. und M. WEIMER, 2006: Multiple Vergleiche mit der SAS-Prozedur MIXED. 171-187. In: KAISER, K. und BÖDEKER, R.-H. (Hrsg.) 2006: Statistik und Datenanalyse mit SAS. Proceedings der 10. Konferenz der SAS-Anwender in Forschung und Entwicklung (KSFE), 242 S.
- WALTER, U., K. FLATH, E. MOLL, J. PROCHNOW und E. SACHS, 2000: Methodische Anleitung zur Bewertung der partiellen Resistenz von Sorten bzw. Linien unter Berücksichtigung epidemiologischer Aspekte. 9-14. In: MOLL, E., K. FLATH, H.-P. PIEPHO (Hrsg.), 2000: Die Prüfung von Pflanzen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Schadorganismen in der Biologischen Bundesanstalt, Teil 3: Methodische Anleitung zur Bewertung der partiellen Resistenz von Getreidesortimenten und die SAS-Applikation RESI, Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Heft 374, 128 S.

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 Ertragsverlusten 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. acuformis* (syn. *T. acuformis*, anamorph: *Helgardia acuformis*) (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 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*.

Einleitung

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

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. acuformis* (syn. *T. acuformis*, anamorph: *Helgardia acuformis*) (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* und 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*

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*), ‚CappelleDesprez‘ (*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
CapelleDesprez (<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 Pathogen-DNA 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 Bulk Segregant Analysis (BSA) und 256 AFLP Kombinationen

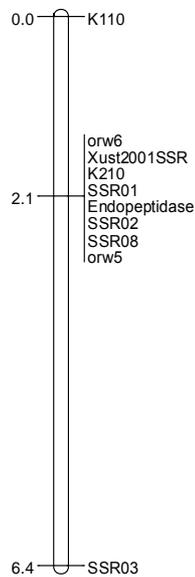


Abbildung 1: Kopplungsgruppe auf Chromosom 7D für die Population BAZ7/10 berechnet mit JoinMap 4.0. Endopeptidase *EpD1b* cosegregiert mit 1 AFLP-Marker (K210) und mehreren SSR-Markern.

(*EcoRI*×*MseI*) 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.

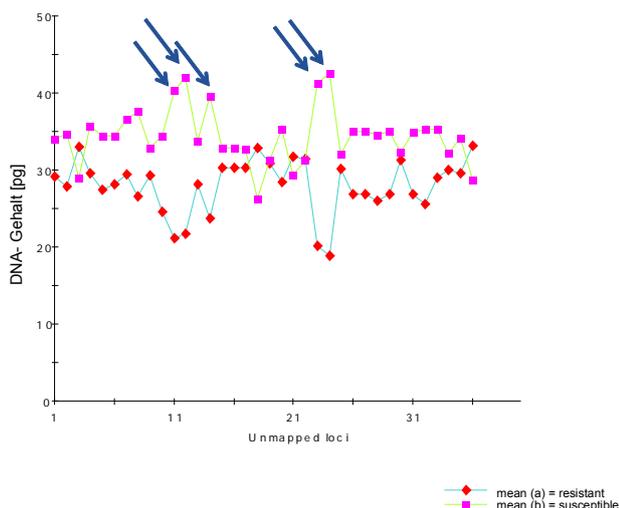


Abbildung 2: Mittelwertvergleich nach Krustal-Wallis für 36 Polymorphismen zwischen anfälligen und resistenten Bulks gegenüber *Oculimacula* spp. 5 AFLP-Fragmente (Pfeil) zeigen hochsignifikante Unterschiede im Mittelwertvergleich.

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 zytogenetische 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. Pflanzzüchertagung*, 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 kotschyi* 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.

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 Gerstengenpool 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	Escaladadura	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

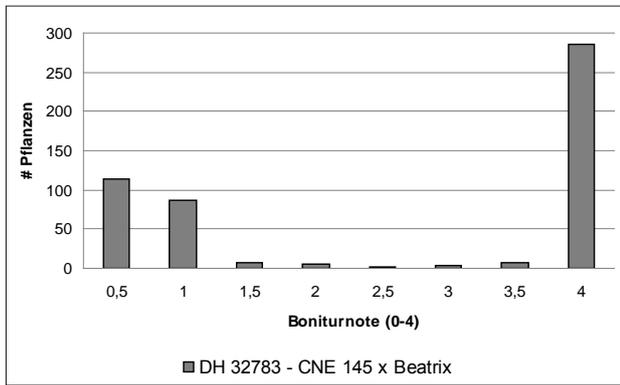


Abbildung 1: Verteilung der Linien der DH-Population 32783 auf die GWH-Boniturnoten

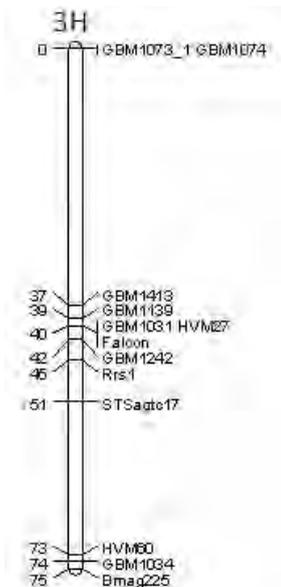


Abbildung 2: Genetische Karte des Centromerbereichs von Chromosom 3 H in der DH 32783

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.*

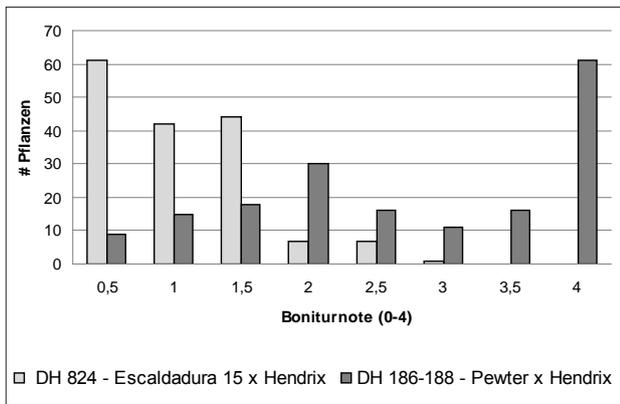


Abbildung 3: Verteilung der Linien der DH-Populationen 824 und 186-188 auf die Boniturnoten

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)

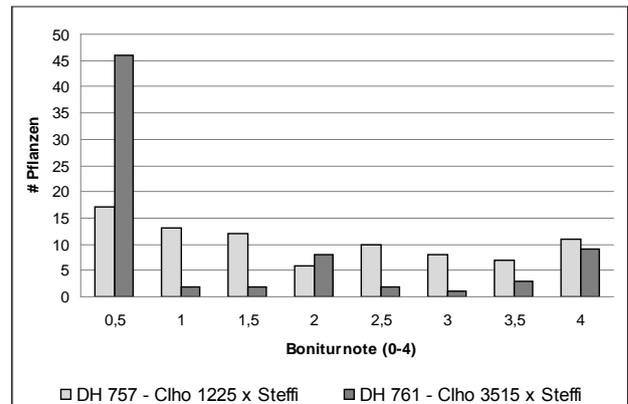


Abbildung 4: Verteilung der Linien der DH-Populationen 757 und 761 auf die Boniturnoten

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 linkschiefe 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

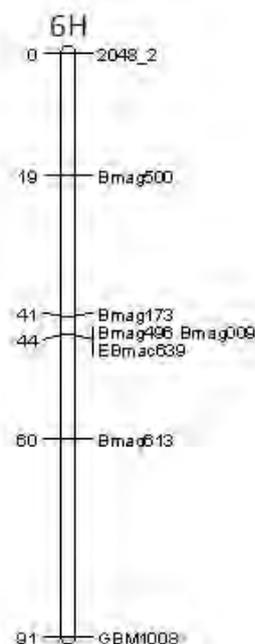


Abbildung 5: Genetische Karte des kurzen Arms von Chromosom 6 H in der DH 761

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. MACKKEY, 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.

Improving the yield, processing quality and disease and pest resistance of potatoes by genotypic recurrent selection

John E. Bradshaw^{1*}

Abstract

This paper starts with a brief summary of potato germplasm collections, potato domestication, the introduction of the crop to Europe and its subsequent history, and potato breeding. It then describes a potato breeding programme which was started at the Scottish Crop Research Institute (SCRI) in 1991 with the aim of improving the yield, processing quality and disease and pest resistance of potatoes by genotypic recurrent selection. The initial germplasm was past introgressions from the Commonwealth Potato Collection. The programme made use of progeny tests developed at SCRI and has involved cycles of crossing, selection between progenies (full-sib families) and clonal selection within the selected families. In the fourth cycle we showed how new breeding objectives and germplasm could be accommodated whilst continuing to maintain the progress which was confirmed at the end of that cycle. The paper concludes with brief comments on a continuing need in Europe for new cultivars to increase potato usage in economically and environmentally sustainable ways.

Keywords

Commonwealth Potato Collection, introgression, population improvement, potato breeding, water and fertiliser use

Introduction

Wild relatives and genebanks

Recognition of Central and South America as the centres of origin and diversity of tuber-bearing *Solanum* species resulted in numerous collecting expeditions, from those pioneered by the Russians in the 1920s to the more recent ones in the 1990s. The collecting expeditions led to the establishment of a number of potato germplasm collections:

- World Collection at International Potato Center (CIP), Lima, Peru
- Commonwealth Potato Collection (CPC), Dundee, Scotland
- Dutch-German Potato Collection (CGN), Wageningen, The Netherlands
- Groß Lusewitz Potato Collection (GLKS), IPK, Groß Lusewitz, Germany

- Potato Collection of Vavilov Institute (VIR), St. Petersburg, Russia
- US Potato Genebank (NRSP-6), Sturgeon Bay, Wisconsin, USA
- Potato Collections in Argentina, Bolivia and Peru

At SCRI, since 1965, we have maintained the CPC, an extremely valuable germplasm collection dating back to 1938. It comprises 1500 accessions: two thirds wild species (80), one third cultivated potatoes (BRADSHAW and RAMSAY 2005).

Domestication

More than 7000 years ago, domestication took place in the Andes of southern Peru from the northern group of members of the *S. brevicaulis* complex of species (SPOONER et al. 2005). The result of domestication was the diploid species *S. stenotomum* from which six other cultivated species were derived, including *S. tuberosum*, which became the most widely grown one in South America, and *S. phureja* which became the second most widely grown one. *S. tuberosum* is a tetraploid ($2n = 4x = 48$) species that displays tetrasomic inheritance (HAWKES 1990). The short-day adapted land-race populations of the Andes and the long-day adapted ones of coastal Chile are genetically distinct groups (RAKER and SPOONER 2002) that have been classified both as separate subspecies (*S. tuberosum* subsp. *andigena* and subsp. *tuberosum*) and as groups within *S. tuberosum* (Gp Andigena and Gp Tuberosum), along with the other cultivated potatoes (DODDS 1962). Initially the potato was a staple food; but after its introduction to Europe and North America it was selected for use as a table vegetable, for processed products (French fries, crisps) and for starch production.

Potato history in Europe

The potato was first introduced from South America into the Canary Islands around 1562, and from there to mainland Europe (HAWKES and FRANCISCO-ORTEGA 1993) in subsequent years. It now seems safest to assume that the early introductions of cultivated potatoes to Europe came from both the Andes and coastal Chile. Analysis of DNA from 49 herbarium specimens has confirmed the presence in Europe of Andean potatoes from around 1700 and Chilean potatoes from 1811 (AMES and SPOONER 2008). Key stages in its history in Europe were:

¹ Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee DD2 5DA, UK

* Ansprechpartner: JOHN E. BRADSHAW, john.bradshaw@scri.ac.uk

- Introduced at end of 16th century.
- Initially a botanic curiosity.
- Potential as food crop first seen in Ireland at end of 17th century.
- The 18th century (the 1700s) saw the potato accepted as a foodstuff throughout Europe because of the need to overcome food shortages for military and economic development.
- French fries became a culinary item in France around 1800 and were introduced into England in the 1860s where they were soon sold with fish (fish and chips). Industrial production developed from the 1950s.
- Potato chips (crisps) have a US origin dating back to 1853, but commercial production did not get underway until 1895. From the 1920s to the present day there have been many technical innovations.

Potato breeding

Potato breeding began in 1807 in England when Knight made the first recorded hybridizations between varieties by artificial pollination (KNIGHT 1807). It then flourished during the second half of the 19th century when many new cultivars were produced by farmers, hobby breeders and seedsmen, and has continued to the present day. The period since 1900 has seen the development of scientific breeding methods based on genetic principles. For example, this was the aim of the Scottish Plant Breeding Station (SPBS) which was founded in 1920.

Early on at SPBS it became apparent that the European potato lacked genes for resistance to what were, or became, major diseases and pests. Hence desirable genes were introgressed from the wild and cultivated species of Latin America; first for late blight resistance (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) from 1932, then for resistance to potato virus Y (PVY) and potato virus X (PVX), from 1941, and finally for resistance to potato cyst nematodes (PCN, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*) from 1952. Past introgressions were (BRADSHAW and RAMSAY 2005):

- Late blight resistance from *S. demissum*
- Ny gene for PVY resistance from *S. demissum*
- Ny gene for PVY resistance from *S. chacoense*
- Ry gene for PVY resistance from *S. stoloniferum*
- Rx gene for PVX resistance from *S. acaule*
- Rx gene for PVX resistance from *S. tuberosum* Gp Andigena
- H1 gene for *G. rostochiensis* resistance from *S. tuberosum* Gp Andigena
- 'H3' *G. pallida* resistance from *S. tuberosum* Gp Andigena
- PCN resistance from *S. vernei*

Combining late blight resistance, virus resistance and two sources of PCN resistance

By 1990 cultivars and clones were available with resistances to late blight, viruses and potato cyst nematodes; but no sys-

tematic attempt had been made to combine them in a single cultivar, although parents for crossing had been chosen to complement one another for desirable characteristics.

Therefore, in 1991, a multitrait (MT) breeding programme was started at SCRI to combine quantitative resistances to late blight and the white potato cyst nematode (*G. pallida*) with commercial worth as judged by breeders through a visual assessment of tubers (breeders' preference) (BRADSHAW et al. 2003). Quantitative resistances were used because major gene resistance to late blight had not proved durable and major gene resistance to pathotype Pa2/3 of *G. pallida* had not been found. The parents with resistance to pathotype Pa2/3 of *G. pallida* also had either major gene (H1) or quantitative resistance to pathotype Ro1 of *G. rostochiensis*, the golden potato cyst nematode, pathotypes Pa2/3 and Ro1 being the ones present in Britain. Parents were also included with resistance to potato leafroll virus, potato virus Y and potato virus X, but time and resources did not permit direct selection for virus resistance in each generation (SOLOMON-BLACKBURN and BRADSHAW 2007). Such an overall combination of traits was, and still is, lacking in European potato cultivars, despite 50 years of breeding effort.

The breeding programme has made use of progeny tests developed at SCRI (BRADSHAW et al. 2003) and has involved cycles of crossing, selection between from 120 to 145 progenies (full-sib families), and clonal selection within the selected progenies. We have shown that the breeding scheme can operate on a three year cycle with limited within progeny selection, and on a five or six year cycle with more extensive within progeny selection. Six years are required when resistance to late blight is assessed in the tubers as well as the foliage. The more extensive within progeny selection is recommended once genes have been combined from sufficient parents to achieve one's objectives. Even so, these cycle lengths are much shorter than the time from making a cross to releasing a new cultivar which has averaged 13 years since 1975, a year longer than the target of 12 years (MACKAY 2005). This would be the cycle time if one waited for release of a cultivar before using it as a parent. Furthermore, we have previously shown that progeny testing provides a solution to the common but ineffective practice in potato breeding of intense visual selection of quantitative traits between seedlings in a glasshouse and spaced plants at a seed site (BRADSHAW and MACKAY 1994, BRADSHAW et al. 1998).

The yield increase after three cycles of indirect selection through breeders' visual preference was only modest because it was operating against a decrease which would occur in the absence of selection. A practical improvement in the scheme would be to increase the number of progenies assessed to over 200, given the moderate to high heritabilities of the progeny and clonal tests. But this would require a considerable effort because the success rate achieved with the potato pollinations was typical at just over 30%.

In the fourth cycle we showed how new breeding objectives and germplasm could be accommodated whilst continuing to maintain progress, something that is important in any long term breeding strategy. It was decided that clones

emerging from the programme for use as parents in commercially funded breeding programmes would be of more value if they had improved processing quality, given that 50% of the British potato crop is now processed. Hence five SCRI cultivars with processing quality were added as parents together with three new blight resistant parents that were available from another project. Blight resistance could also be classified as a new breeding objective because of changes in the *P. infestans* population in Britain.

The new germplasm continued in the breeding scheme only if it was selected from the progeny tests which included existing germplasm. Thus 54 successful crosses were made in 2003 (cycle 4) in addition to the 68 from the 15 MT parents from cycle 3, but just six progenies were good enough to enter the breeding programme along with 19 from the 68 progenies. When the recurrent selection operates on a five or six year cycle to include clonal selection, potential new parents can be included for assessment, and these could include new cultivars selected from earlier cycles. Again, however, their progenies would survive only if superior to those from the most recent cycle. If, as a result, germplasm containing desirable genes failed to enter the breeding programme, then consideration should be given to introgression of the genes or improvement of the germplasm in a separate population improvement programme.

The 108 clones selected from cycle 4 were assessed in 2007 and 2008 and compared with Maris Piper, the most widely grown cultivar in Britain. These assessments confirmed that none of the original 36 parents combined late blight and *G. pallida* resistance whereas this was achieved with two of the 15 clones selected from the third cycle and 23 of the 108 clones selected from the fourth cycle. They had foliage blight scores greater than or equal to 5.5 (\leq 40% necrotic tissue) compared with a score of 2.5 ($>$ 80% necrotic tissue) for susceptible cultivar Maris Piper, 25 days after infectors were placed in the spreader rows of the field trial. They had less than 22.5% of their tubers infected with tuber blight, compared with 45% for Maris Piper. They also had *G. pallida* scores of \leq 3.08 (square root of cyst number) which was taken as the cut-off point for resistance because it was the highest score of the nine original parents with resistance. Among the 23 clones were 16 with an acceptable fry colour after storage at 10°C (score \geq 4.5, on a 1 (dark) to 9 (light) scale), and of these, five were not significantly ($P > 0.05$) lower yielding than Maris Piper (yields $>$ 15.66 kg/plot compared with 19.41).

Three of these were used as parents in commercially funded breeding programmes in 2008, together with a lower yielding one which molecular markers indicated had *S. tuberosum* Gp Andigena derived *G. pallida* resistance. Also used were four clones that proved more susceptible to tuber blight once these results were known in 2008. Three of these clones were relatively high yielding and one had good fry colour after cold storage at 4°C. It can therefore be concluded that good progress has been made in producing clones which combine resistances to late blight and potato cyst nematodes with improved yield and processing quality.

Future needs and prospects

There is a continuing need in Europe for new cultivars to increase potato usage in economically and environmentally sustainable ways. Economic benefits will come from cultivars that give higher yields of saleable product at less cost of production. However, it is not obvious that this can be achieved from crosses between modern cultivars, remembering that potatoes have a high harvest index. Yield heterosis (hybrid vigour) is seen in crosses of modern cultivars to long-day adapted populations of Gp Andigena and Gp Phureja/Stenotomum; but these populations need improving for other traits to have real impact because they are not as good as intensively selected Gp Tuberosum.

Environmental benefits will come from cultivars that have inbuilt resistance to pests and diseases, particularly to *G. pallida* and *P. infestans*. In England and Wales over 60% of potato fields are infested with *G. pallida* and 10 late blight sprays are normal practice as susceptible cultivars are widely grown. Whilst good progress is being made with resistance to PCN, durable resistance to late blight remains elusive. A new genotype of *P. infestans*, 'blue' 13_A2, has dramatically increased in Britain over the three years 2005 to 2007 to account for more than 70% of the population (COOKE et al. 2008). It is an aggressive metalaxyl resistant A2 mating type isolate which has overcome the resistance in cultivars Stirling and Torrion, two out of the best three parents used for blight resistance in 1991. Hence further new sources of resistance are desirable despite two of the 15 clones selected from cycle 3 and 23 of the 108 clones selected from cycle 4 having useful resistance to genotype 'blue' 13_A2 as well as to *G. pallida*. Resistance to *P. infestans* genotype blue_13 has been found in the CPC in accessions of *S. brachycarpum*, *S. bulbocastanum*, *S. capsicibaccatum*, *S. chacoense*, *S. commersonii*, *S. demissum*, *S. iopetalum*, *S. okadae*, *S. polyadenium*, *S. stoloniferum* and *S. verrucosum*; but it is not obvious if they will prove durable.

Environmental benefits will also come from new cultivars that can make better use of water and fertilisers (N and P). In Britain most potato growing is in nitrate vulnerable zones; potatoes occupy 2.5% of arable land but consume 8% of P-fertiliser and P enrichment of surface water is a problem; and half of the irrigation water applied in England goes on potatoes. With climate change there is likely to be competition for water resources between agricultural, industrial and domestic users. It is not yet clear if cultivated potatoes or wild species will provide the necessary germplasm for improvement in these traits, but our initial focus is on root architecture and its effect on water and mineral uptake and we are looking at the correlation between field and glass-house grown potatoes.

Prospects are good for new cultivars that can be stored below 6°C without sweetening (reducing sugar production) and hence can be used out of storage for producing acceptable fried products. Such storage would result in a reduction in the use of sprout suppressants when compared with current storage at 6°C to 10°C. The use of such cultivars may also result in lower levels of acrylamide in

fried products, current levels being perceived as a potential health risk.

Finally new cultivars, such as the Phureja cultivars released from SCRI since 2001, are likely to provide consumers with novel potato products and convenience foods and potatoes with improved flavour and nutritional and health benefits.

Acknowledgements

Funding from the Scottish Government (Rural and Environment Research and Analysis Directorate) is gratefully acknowledged, as is the help of many colleagues over many years.

References

- AMES, M. and D.A. SPOONER, 2008: DNA from herbarium specimens settles a controversy about origins of the European potato. *Am. J. Bot.* 95: 252-257.
- BRADSHAW, J.E. and G.R. MACKAY, 1994: Breeding strategies for clonally propagated potatoes. *In: J.E. Bradshaw and G.R. Mackay (Eds.), Potato Genetics*, pp. 467-497. CAB International, Wallingford, UK.
- BRADSHAW, J.E. and G. RAMSAY, 2005: Utilisation of the Commonwealth Potato Collection in potato breeding. *Euphytica* 146: 9-19.
- BRADSHAW, J.E., M.F.B. DALE, G.E.L. SWAN, D. TODD and R.N. WILSON, 1998: Early-generation selection between and within pair crosses in a potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) breeding programme. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1331-1339.
- BRADSHAW, J.E., M.F.B. DALE and G.R. MACKAY, 2003: Use of mid-parent values and progeny tests to increase the efficiency of potato breeding for combined processing quality and disease and pest resistance. *Theor. Appl. Genet.* 107: 36-42.
- COOKE, D.E.L., A.K. LEES, D.S. SHAW, M.C. TAYLOR, M.W.C. PRENTICE, N.J. BRADSHAW and R.A. BAIN, 2008: The status of GB blight populations and the threat of oospores. *Proceedings Crop Protection in Northern Britain 2008*: 217-222.
- DODDS, K.S., 1962: Classification of cultivated potatoes. *In "The Potato and its Wild Relatives"* (D.S. Correll, Ed.), pp. 517-539. Texas Research Foundation, Renner, Texas.
- HAWKES, J.G., 1990: *The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*. Belhaven Press, London.
- HAWKES, J.G. and J. FRANCISCO-ORTEGA, 1993: The early history of the potato in Europe. *Euphytica* 70: 1-7.
- KNIGHT, T.A., 1807: On raising of new and early varieties of the potato (*Solanum tuberosum*). *Trans. Hort. Soc. Lond.* 1: 57-59.
- MACKAY, G.R., 2005: Propagation by Traditional Breeding Methods. *In: M.K. Razdan and A.K. Mattoo (Eds.), Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volume I: Potato*, pp. 65-81. Science Publishers, Inc., Enfield, USA.
- RAKER, C.M. and D.M. SPOONER, 2002: Chilean tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations: microsatellite data. *Crop Sci.* 42: 1451-1458.
- SOLOMON-BLACKBURN, R.M. and J.E. BRADSHAW, 2007: Resistance to *potato virus Y* in a multitrait potato breeding scheme without direct selection in each generation. *Potato Res.* 50: 87-95.
- SPOONER, D.M., K. MCLEAN, G. RAMSAY, R. WAUGH and G.J. BRYAN, 2005: A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102: 14694-14699.

Introduction to the current results of potato breeding programme at Keszthely

Zsolt Polgar^{1*}, Istvan Wolf¹, Istvan Cernak¹ and Janos Taller²

Abstract

At Keszthely a 50 years long resistance breeding program prospers based on the utilisation of wild species germplasm and strict selection for combining quality traits with complex biotic and abiotic resistance. Most of the research projects promotes this programme also. Currently the Centre has 12 released varieties being unique in their kind, where resistances are combined with high yielding ability, excellent table quality as well as a range of cooking types, flesh and skin colour.

The efficiency of breeding for PVY resistance started to be enhanced by developing of parental lines having the resistance gene in hetero duplex state where resistance genes originates from different species and by developing DNA markers linked to the gene of *Ry_{sto}*. Four RAPD marker and one SCAR marker was developed and tested to identify *Ry_{sto}* gene in crossing populations and in varieties. Using commercial and biotech breeding techniques new variety candidates were bred having complex resistance and high chipping quality.

Key words: pathogen resistance, resistance breeding, wild *Solanum* species, chipping quality, markers assisted selection

Variety breeding

Hungarian ecological conditions due to the high number of aphids throughout to the whole growing season are highly favourable for virological degeneration of potato. By the appearance of new potato virus Y strains, the tobacco necrotic strain in the early sixties and tuber necrotic strain in early eighties, old local varieties being susceptible for these viruses completely disappeared from production. In 1960 a breeding program was started at Keszthely to develop new varieties where quality traits are combined with wide range of biotic and abiotic stress resistance. The program intensively utilised the germplasm of different potato species by the application of artificial infection and mass selection techniques (Table 1). From the program currently 12 released variety is on the list of EU. These varieties are unique in their kind. All of them have extreme resistance (immunity) to PVY, PVX and PVA, high field resistance to PLRV. Out of the twelve 9 variety has resistance to cyst nematode (*G. rostochiensis*), potato wart (*S. endobioticum*) and common scab (*S. cabbies*). More over two varieties has high resistance to potato late blight (*P. infestans*) as well. As

Table 1: Main potato species used in the breeding program to introduce resistance genes into new varieties

Species	Resistance gene for
<i>Solanum tuberosum</i>	PLRV
<i>S. tub. ssp. andigenum</i>	PLRV, nematodes
<i>S. stoloniferum</i>	PVY, PVA
<i>S. acaule</i>	PVX
<i>S. demissum</i>	Phytophthora
<i>S. hougasii</i>	PVY, PVS
<i>S. vernei</i>	nematodes
<i>S. brevidens</i>	PLRV, Erwinia ssp.
<i>S. sparsiphyllum</i>	Verticillium
<i>S. tariense</i>	Pests resistance

the varieties were selected under non irrigated, continental climatic conditions they show higher tolerance to heat and drought stress as well as higher physiological stability then varieties bred under more preferable conditions for potato. The resistances are combined with high yielding ability, good table quality and taste, and a variety of cooking types, flash and skin colour. In 2006, variety Vénusz Gold having one of the most complex resistance was released as specially advised for organic production by the Hungarian Agricultural Qualification Institute.

Since 12 years ago a sub breeding program was started to develop industrial varieties with complex resistances. Up till now considerable results were achieved on development of new breeding lines where virus, nematode, wart and late blight resistance is combined with wanted low sugar and high dry matter content, acceptable frying colour and round shape, yellow skin (Figure 1). A number of variety candidates are available now for intensive testing before entering registration process.

Enhancing selection process

Development of parental lines caring PVY resistance gene in a hetero multiplex state

By the use of parental lines having the resistance gene in duplex, triplex or even quadruplex state the ratio of resistant genotypes in their progenies from a cross with a susceptible parent can be dramatically increased. Consequently the selection process for the combination of resistance with quality traits can be more effective. In multiplex genotypes were the alleles originates from different sources (eg. different species) the achieved resistance can be more durable

¹ University of Pannonia, Centre of Agricultural Sciences, Potato Research Centre, Deák F. str. 16., H-8360 KESZTHELY

² University of Pannonia, Department of Plant Science and Biotechnology, Deák F. str. 16., H-8360 KESZTHELY

* Ansprechpartner: Dr. Zsolt Polgar, polg-zs@georgikon.hu

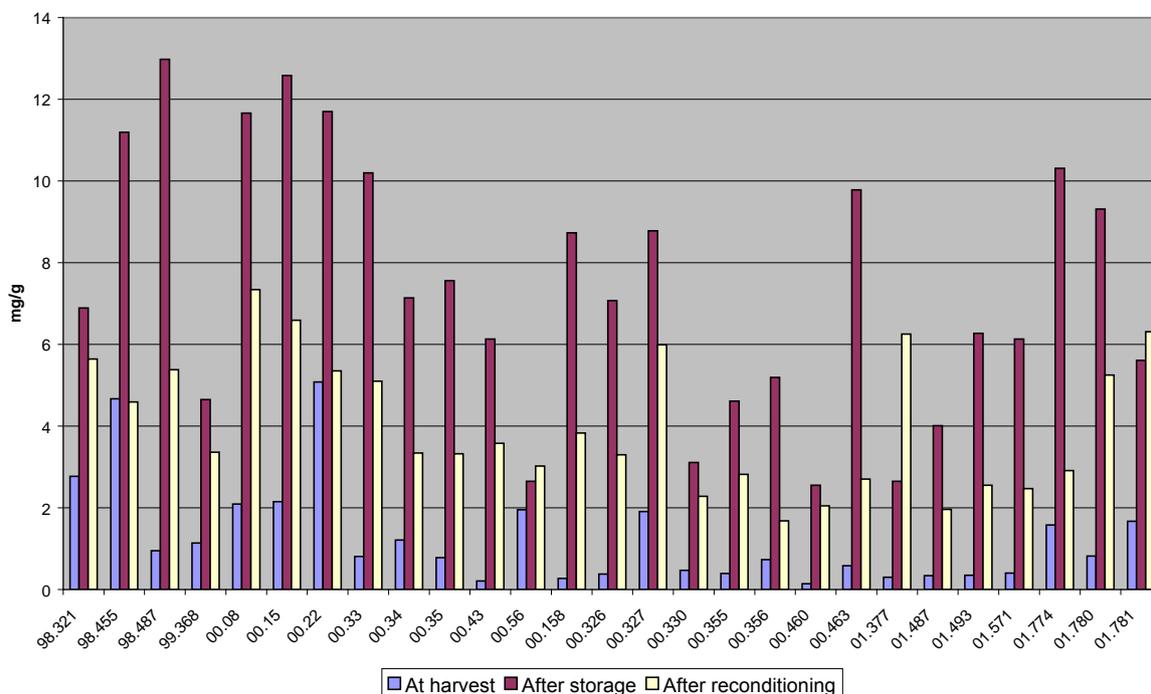


Figure 1: Reducing sugar content of potato breeding lines at different stage of storage

compared to genotypes where the resistance is based only on one particular allele. In the past PVY showed up its tendency to form new resistance breaking strains (N and NTN). Breeding efforts were made to develop parental lines where the PVY resistance gene is in a hetero multiplex state, where alleles are originating from different wild potato species (POLGAR et al. 2002). Currently these lines are intensively used in our breeding programme.

Development of molecular markers linked to the extreme resistance gene *Ry* of *S. stoloniferum*

The efficiency of commercial breeding for resistances can be elevated by the use of genetic markers linked to the resistance gene (MAS). For this purpose we developed four RAPD markers linked to the *Ry* gene by bulk segregant

Table 2: Segregation ratio of potato breeding lines for PVY resistance in test crosses

Line	Tested No.	Healthy No.	Infected No.	Infected %	Chi ²
89.243	275	236	39	39/275	1,223*
90.315	225	187	38	38/225	0,008*
90.350	62	35	27	43,5	1,032**
90.364	89	77	12	13,5	0,649*
94.1111	49	36	13	26,5	3,433*
94.1112	83	71	12	14,5	0,292*
96.322	68	57	11	16,2	0,012*
96.330	108	86	22	39/558	1,067*
96.332	57	30	27	47,4	0,158**
96.345	59	47	12	20,3	0,573*
97.607	88	43	45	51,1	0,045**
Hermes	20	3	17	85	-
Desiree	100	73	27	27	-

* Not significantly different from 5:1, resistant : susceptible segregation ratio, p 0,05

** Not significantly different from 1:1, resistant : susceptible segregation ratio, p 0,05

Table 3: Origin of PVY resistance gene in identified multiplex parental lines

No.	Parental combination, source of <i>Ry</i> gene (Ny*) ♀ x ♂	No. of identified multiplex lines
1	<i>S. stoloniferum</i> (sto) x <i>S. hougasii</i> (hou)	3
2	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>adigena</i> (adg) x <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (adg)	2
3	<i>S. stoloniferum</i> (sto) x <i>S. chacoense</i> (chc)*	1
4	<i>S. stoloniferum</i> (sto) x <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (adg)	1
5	(<i>S. stoloniferum</i> (sto) x <i>S. hougasii</i> (hou)) x <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (adg)	1

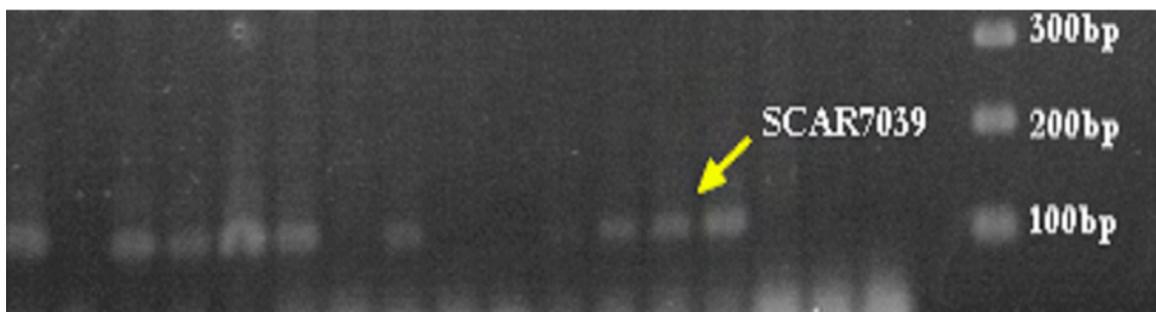


Figure 2: Detection of presence or absence of Rysto gene in 17 potato varieties by SCAR7039 marker

analysis (CERÁK et al. 2008). By the combined application of one of this markers with STM0003-111 marker published by MILBURNE et al. (1998) the identification of resistance genotypes in different crossing population reached the 98 % efficiency. Recently one of the markers was transformed to an even more reliable SCAR marker. This marker could be applied efficiently to identify the resistance gene in 21 potato varieties (Figure 2). Research is under progress for mapping the Rysto gene by saturation the gene region with physically closer markers.

Conclusions

By long term and intensive efforts it is possible to combine resistance genes of wild *Solanum* species with preferred quality traits of cultivated potato. By the use of resistant varieties higher yielding stability can be reached, the demand of environmental and food safety can be realised

while production cost can be decreased. For future success newer commercial as well as modern DNA techniques like MAS are available for the breeders.

References

- CERNÁK, I., J. TALLER, I. WOLF, E. FEHÉR, G. BABINSZKY, Z. ALFÖLDI, G. CSANÁDI and Z. POLGÁR, 2008: Analysis of the applicability of molecular markers linked to the PVY extreme resistance gene Ry_{sto} , and the identification of new markers. *Acta Biologica Hungarica* 59 (2), 195-203.
- MILBURNE, D., R.C. MEYER, A.J. COLLINS, R.D. RAMSEY, C. GEBHARDT and R. WAUGH, 1998: Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol. Gen. Genet.* 259: 233-245.
- POLGÁR, Z., I. WOLF and S. Horvath, 2002: Development of parental lines having resistance genes against PVY^{NTN} in hetero multiplex state. 15th Triennial Conference of the European Association for Potato Research, July 14-19, 2002, Hamburg, Germany, Abstracts of Papers, p. 98.

Kartoffelzüchtung in Österreich

Felix Fuchs^{1*}

Selektion unter zusätzlicher Berücksichtigung wesentlicher Kriterien des Biolandbaus

Entstehungsgeschichte und bisherige Leistungen

In Österreich wurde im Vergleich zu anderen europäischen Ländern sehr spät mit der Züchtung von Kartoffelsorten begonnen. Nach dem 2. Weltkrieg kam man in den Landwirtschaftskammern von Nieder- und Oberösterreich mit der Zeit zur Auffassung, dass eine eigene Züchtung von Vorteil und daher förderungswürdig wäre. Folglich hat man sich 1950 fast gleichzeitig bei der NÖ. Saatbaugenossenschaft (NÖS) und bei der SAATBAU LINZ entschlossen in die Kartoffelzüchtung einzusteigen. Diese wurde 1990 auf oberösterreichischer Seite eingestellt und die verbliebenen Sorten wurden von der NÖS übernommen.

Die bisherige Bilanz aus der züchterischen Tätigkeit sieht folgendermaßen aus: 47 Sorten seitens der NÖS, davon 20 noch auf diversen Sortenlisten bzw. in Vermehrung und 28 Sorten der SAATBAU LINZ, davon noch 3 auf der österreichischen Liste und nur 2 in Vermehrung.

In der österreichischen Sortenliste eingetragene Züchtungen

NÖS	SAATBAU LINZ
Nagelerner Kipfler (1956)	Linzer Delikatess (1975)
Hermes (1973)	Goldsegen (1990)
Zenith (1976)	Expander (2000)
Sigma (1977)	
Gina (1988)	
Ditta (1989)	
Romina (1989)	
Komet (1990)	
Pluto (1992)	
Bionta (1993)	
Merkur (1994)	
Evita (1995)	
Ares (1997)	
Roko (1998)	
Tosca (2002)	
Husar (2004)	
Valeria (2005)	
Fabiola (2006)	
Pandora (2007)	
Erika (2008)	

Bedeutung der österreichischen Züchtungen

- 40 % Anteil an allen in der österreichischen Sortenliste eingetragenen Sorten
- ca. 45-50 % Anteil am gesamten österreichischen Kartoffelmarkt
- ca. 60 % Anteil an der österreichischen Saatgutproduktion
- steigender Anteil am mitteleuropäischen Speisemarkt

Aktuelle Situation der Neuzüchtung in Österreich

In Österreich wird Gentechnik vermutlich auch in Zukunft von der Mehrheit der Bevölkerung abgelehnt. Aus diesem Grund und auch wegen der extrem hohen Kosten ist Gentechnik nach wie vor kein Thema für die NÖS. Auch Züchtungsprogramme mit Diploiden bzw. Dihaploiden stehen momentan nicht zur Diskussion. Hier stellen ebenfalls die hohen Kosten ein Problem dar. Weiters ist man nicht ganz von den Erfolgsaussichten dieser Programme überzeugt.

Momentaner Stand der Neuzüchtung in Österreich

Umfang

- Kreuzungsarbeiten in Meires und Naglern
- Anzucht von jährlich 44.000 Sämlingen in Meires

Zielsetzung

Geeignete Sorten für sämtliche Verwertungsrichtungen, vor allem für den österreichischen Markt aber auch in zunehmendem Maße für das Ausland

Methodik

- Traditionelle Form der Neuzüchtung d.h. ausschließlich Kreuzungen zwischen tetraploiden Sorten und Stämmen
- kein Einsatz von Gentechnik
- keine Programme mit Diploiden oder sonstige Sonderprogramme
- übliche Form der Selektion (noch keine Anwendung von Markergenen)

Perspektiven für die Neuzüchtung

Damit kommt man zu den zukünftigen Selektionskriterien bzw. Zuchtzielen.

Grundlegende Ziele, wie hoher Ertrag, kombiniert mit Qualität und möglichst vielen Resistenzen, werden sich nicht ändern. Es gibt auch zahlreiche neue Anforderungen des Marktes. Es bestehen gute Chancen mit der herkömmlichen Züchtungsmethodik erfolgreich zu sein.

¹ NÖ Saatbaugenossenschaft, Meires 25, A-3841 WINDIGSTEIG

* Ansprechpartner: Dipl.-Ing. Felix FUCHS, meires@noes.at

Neue Anforderungen des Marktes

- Amylosefreie Stärkesorten
- Sorten mit höherem Proteingehalt
- Pommes Frites - Sorten mit geringerer Neigung zur Acrylamidbildung
- Baby-Sorten
- Rot- und Violettfleischige Sorten
- Biosorten

Biosorten-Züchtung

Die NÖS beschäftigt sich seit ca. 4 Jahren mit diesem Teilbereich der Züchtung. Was waren die Gründe für den Einstieg?

- a) Steigende Bedeutung des Bio-Sektors
- b) Häufige Nachfrage nach Sorten, die besser mit den Gegebenheiten des Biolandbaus zurechtkommen
- c) Ein gewisser Anstoß durch die Teilnahme an einem 3-jährigen Forschungsprojekt, das von der BIO FORSCHUNG AUSTRIA initiiert wurde

Die wichtigsten österreichischen Züchterfirmen waren an diesem Projekt beteiligt.

Seitens der Bio-Landwirte gibt es eine große Anzahl von Wünschen, die zum Teil illusorisch sind.

Anforderungen an Bio-Kartoffelsorten

- Qualitäts- und Ertrageigenschaften wie im konventionellen Bereich
- Hohes Nährstoffaneignungsvermögen (geringe Ansprüche an Nährstoffversorgung)
- Erhöhte Phytophthoresistenz
- Erhöhte Virusresistenz (im Hinblick auf Bio-Vermehrung)
- Ausreichende Bodendeckung zwecks Unkrautunterdrückung
- Geringe Attraktivität für tierische Schädlinge wie Kartoffelkäfer und Drahtwurm

Auf Grund dieser Anforderungen kann man sagen, dass jede neue Sorte, die für die ökologische Landwirtschaft geeignet ist, auch im konventionellen Bereich erfolgreich sein müsste.

Im Rahmen des genannten Projektes mit BIO FORSCHUNG AUSTRIA wurde bezüglich Biosorten-Züchtung ein Konzept entwickelt, das in den nächsten Jahren in Österreich Geltung haben sollte.

*Momentane Strategie hinsichtlich**Biokartoffel-Sortenzüchtung in Österreich*

- Im Wesentlichen Beibehaltung des konventionellen Züchtungsschemas, d.h. Selektion großteils auf konventionell bewirtschafteten Flächen
- Berücksichtigung der Anforderungen des BIO-Landbaus bei der Auswahl der Kreuzungseltern
- Im 4. Feldjahr erstmalig zusätzlich Kleinparzellenversuche auf einem BIO-Standort im Waldviertel

Biologischer Kartoffelbau in Österreich

	2004 ha	2005 ha	2006 ha	2007 ha	2008 ha
Saatkartoffel	146	183	185	185	180
Stärkeindustrie-Kartoffel	216	213	114	184	290
Speiseindustrie-Kartoffel	140	169	189	248	229
Speisekartoffel	1.650	1.590	1.802	1.751	1.891
insgesamt ca.	2.152	2.155	2.290	2.368	2.590

Prozentueller Anteil an der Gesamtanbaufläche 2008: 11,50 %

- Ab dem 5. Feldjahr zusätzliche Kleinparzellenversuche auf 3 BIO-Standorten aufgeteilt auf die wichtigsten Produktionsgebiete in Niederösterreich; davon ein Standort unter Bewässerung
- Ab dem 7. Jahr Beginn der 3-jährigen Wertprüfung auf insgesamt 7 Standorten, davon 2 BIO-Standorte
- Gleichzeitig mit der Wertprüfung Praxisversuche bei BIO-Landwirten
- Keine separate nationale Liste für BIO-Sorten sondern nur ein Zusatz in der beschreibenden Liste hinsichtlich Eignung einer Sorte für den BIO-Landbau

Es gab auch die Überlegung einer rein biologisch dynamischen Züchtung mit ausschließlicher Selektion auf biologischen Flächen. Diese Idee wurde aber wieder verworfen, da dabei zuviel Material verlorengeht, das im konventionellen Bereich durchaus erfolgreich sein könnte.

Projektteil der NÖS im Rahmen des von BIO FORSCHUNG AUSTRIA initiierten Projekts

Wesentliche Zielsetzung dieses Projektteils: Auslese von Zuchtstämmen, die den Anforderungen des Biolandbaus entsprechen.

Projektteil (NÖS): Kartoffelzüchtung Selektion unter Berücksichtigung wesentlicher Kriterien des BIO-Landbaus, Projektdauer: 3 Jahre (2005, 2006, 2007)

Versuchsstandorte		
BIO	Sparbach bzw. Schwarzenau	(Waldviertel)
	Untermallebarn	(Weinviertel)
	Aderklaa	(Weinviertel)
KONVENTIONELL	Meires	(Waldviertel)
	Nalgerm	(Weinviertel)

Anzahl der Versuchsglieder: ca. 40 pro Jahr (Stämme und Standardsorten)

Projektteil (NÖS): Kartoffelzüchtung Selektion unter Berücksichtigung wesentlicher Kriterien des BIO-Landbaus: Durchführung

Bonitierung von	Aufgang Entwicklung Bodendeckung Käferbefall Phytophthorabefall
Ermittlung des	Knollenertrages Stärkegehaltes
Beurteilung der	äußeren Qualität (Knollenbonitur) inneren Qualität (Kochprüfung) Verarbeitungseignung

Ertrag in t/ha - Standortdurchschnittswerte

Jahr	Schwarzenau bzw. Sparbach	BIO-Standorte		Konventionelle Standorte	
		Untermallebarn	Aderklaa	Meires	Naglern
2005	26,3	34,8	41,9	42,5	61,1
2006	24,2	34,4	37,5	26,4	48,6
2007	24,5	25,5	37,9	40,3	30,0
Durchschnitt	25,0	31,6	39,1	36,4	46,6

Innere Qualität**Kochprüfung: Gesamtnote - Standortdurchschnittswerte**

Jahr	Schwarzenau bzw. Sparbach	BIO-Standorte		Konventionelle Standorte	
		Untermallebarn	Aderklaa	Meires	Naglern
2005	5,7	6,0	6,1	5,8	5,8
2006	5,7	5,9	6,0	5,8	5,9
2007	5,8	5,9	6,2	5,9	5,8
Durchschnitt	5,7	5,9	6,1	5,8	5,8

Kochprüfung: Graugrüne Beifärbung - Standortdurchschnittswerte

Jahr	Schwarzenau bzw. Sparbach	BIO-Standorte		Konventionelle Standorte	
		Untermallebarn	Aderklaa	Meires	Naglern
2005	6,2	6,5	6,9	6,4	6,7
2006	6,3	6,8	6,6	6,7	6,7
2007	6,2	6,6	6,9	6,3	6,5
Durchschnitt	6,2	6,6	6,8	6,5	6,6

Kochprüfung: Geschmack - Standortdurchschnittswerte

Jahr	Schwarzenau bzw. Sparbach	BIO-Standorte		Konventionelle Standorte	
		Untermallebarn	Aderklaa	Meires	Naglern
2005	5,9	6,0	5,7	5,8	5,7
2006	5,8	5,8	5,6	5,9	5,7
2007	6,0	6,3	5,6	6,1	6,2
Durchschnitt	5,9	6,0	5,6	5,9	5,9

Kochprüfung: Verfärbung - Standortdurchschnittswerte

Jahr	Schwarzenau bzw. Sparbach	BIO-Standorte		Konventionelle Standorte	
		Untermallebarn	Aderklaa	Meires	Naglern
2005	5,7	6,0	6,3	5,6	5,8
2006	5,2	6,3	6,2	5,8	6,0
2007	5,7	6,1	6,4	5,7	6,1
Durchschnitt	5,5	6,1	6,3	5,7	6,0

Ergebnisse und Diskussion

Aus dem großen Umfang von Daten wurden Ergebnisse ausgewählt, die für die Praxis am ehesten von Interesse sein müssten, was sich sowohl auf die Anbauer als auch auf die Konsumenten bezieht.

Es geht dabei um eine Gegenüberstellung von BIO und KONVENTIONELL, aber zum Teil auch um einen Vergleich zwischen den beiden Hauptproduktionsgebieten in Österreich.

Beim Vergleich zwischen BIO und KONVENTIONELL muss man natürlich jene Standorte heranziehen, die räumlich knapp nebeneinander liegen, nämlich Meires und Sparbach und Naglern und Untermallebarn.

Hinsichtlich Ertrag zeigt sich eine deutliche Überlegenheit der konventionellen Standorte gegenüber den Biostandor-

ten. Wie zu erwarten war das Weinviertel dem Waldviertel in beiden Bereichen ertraglich eindeutig überlegen.

Hinsichtlich innerer Qualität zeigten sich insgesamt betrachtet keine signifikanten Unterschiedeschiede zwischen BIO und KONVENTIONELL aber auch nicht zwischen dem Waldviertel und dem Weinviertel. Das widerlegt die gängige Meinung, dass biologisch produzierte und hier vor allem im Waldviertel produzierte Kartoffel qualitativ höher einzuschätzen sind.

Schlusswort

Das wichtigste Ergebnis aus diesen ersten Jahren der Biosorte Züchtung ist für die NÖS darin zu sehen, dass bereits einige vielversprechende Stämme für den Biolandbau selektiert werden konnten und dass der Beste davon im Dezember 2009 zur Eintragung ansteht.

Kartoffelzüchtung in der Tschechischen Republik

Jaroslava Domkárová¹ and Jan Bouma^{1*}

At present, three companies SATIVA Keřkov, a.s., SELEKTA Pacov, a.s., VESA Velhartice, a.s. and partially also Vyzkumny ústav bramborarsky Havlickuv Brod, s.r.o. are directed to potato clonal selection. In 2008 there are registered 159 potato varieties in the Czech Republic, out of these 45 ones are of the Czech origin. Since 1990 a share of Czech registered varieties and also a share of these varieties on potato propagating area has decreased. In strong competitiveness the breeding activity has been subjected to certain changes during recent years and responded to changing requests of consumers and growers. Currently, the breeding activity in the Czech Republic includes breeding of varieties for fresh consumption, potato products and starch production. Recovery of breeding material from PVS and the elaboration of procedure of virus-free potato seed in breeding belong to the most important breeding and research priorities. From the sight of potato breeders, development of new genetic resources usable for breeding, especially for resistance to late blight and internal tuber quality is the priority of potato research. The development of potato gene bank with stress to conservation, maintenance and use of potato gene pool for further research and breeding purposes is another priority of genetic and breeding research.

Keywords: potato, Czech Republic, breeding, genetic resources

In der Tschechischen Republik beschäftigen sich mit der Neuzüchtung vom Kartoffel zur Zeit vor allem drei Gesellschaften SATIVA Keřkov, a.s. (SATIVA), SELEKTA Pacov, a.s. (SELEKTA), Vesa Velhartice a.s. (VESA) und zum Teil auch Vyzkumny ustav bramborarský Havlickuv Brod, s.r.o. (VUB). In diesem Jahr sind 159 Kartoffelsorten zugelassen, davon sind 45 Sorten der tschechischen Herkunft. *Tabelle 1* präsentiert die Entwicklung zugelassener Kartoffelsorten in der Tschechischen Republik seit 1990.

Seit 1990 verringerte sich nicht nur der Anteil von zugelassenen tschechischen Sorten, sondern auch der Anteil von diesen Sorten an der Vermehrungsfläche. *Tabelle 2* präsentiert den prozentuellen Anteil der tschechischen Sorten an der gesamten Vermehrungsfläche zwischen 1997 und 2008.

Aufgeführte Daten bestätigen einen bedeutenden Druck von den Auslandssorten auf dem Kartoffelmarkt. In dieser großen Konkurrenz musste sich die Züchtungsarbeit in den letzten Jahren gewissen Veränderungen unterziehen und hat damit auf wechselnde Anforderungen der Verbraucher und Produzenten reagiert. Die Züchtungstätigkeit in der Tschechischen Republik umfasst die Züchtung von Kartoffelsorten für den Direktverbrauch als auch für verschiedene Kartoffelerzeugnisse und Stärkeerzeugung.

Zur Zeit werden auf den Züchtungsstationen in der Tschechischen Republik nicht nur für Erhaltungszüchtung, sondern auch für Neuzüchtung optimale Bedingungen geschaffen. Die Erholung des Züchtungsmaterials von PVS und Erarbeitung der Vorgänge für die virusfreie Pflanzguterzeugung in der Züchtung gehört zu den wichtigsten Züchtungs- und Forschungsprioritäten.

Eine weitere Priorität der Kartoffelforschung aus Sicht der Züchter ist vor allem die Entwicklung von neuen in der Züchtung verwendbaren genetischen Ressourcen, besonders mit Rücksicht auf die Krautfäule-Resistenz und Innerqualität der Knollen.

Zwischen 2004 und 2007 wurde in Koordination mit Vyzkumny ustav bramborarský Havlickuv Brod im gemeinsamen Projekt QF 4133 Entwicklung des Ausgangsmaterials mit Genen für horizontale Krautfäule-Resistenz gelöst.

Das Ziel des Projekts war

- Durchführung der Hybridisierung vom in US erzeugten Tetraploidmaterial mit einem erhöhten Resistenzgrad, mit ausgewählten Kartoffelsorten unseres Sortiments und Hybriden aus Neuzüchtung

Tabelle 1: Zugelassene Kartoffelsorten zwischen 1990 und 2008

Jahr	Insgesamt	Tschechische Sorten		%
		Neu zugelassen	Insgesamt	
1990	33	0	16	48
1991	38	4	20	53
1992	42	2	22	52
1993	44	1	22	50
1994	46	3	25	54
1995	74	6	33	45
1996	83	3	32	39
1997	91	1	31	34
1998	91	3	31	34
1999	100	2	32	32
2000	102	4	33	32
2001	108	2	33	31
2002	113	2	33	29
2003	116	1	32	28
2004	125	2	33	26
2005	154	7	38	25
2006	167	7	44	26
2007	181	6	46	25
2008	159	3	45	28

¹ Vyzkumny ustav bramborarsky Havlickuv Brod, s.r.o., Dobrovskeho 2366, CZ-58001 HAVLICKUV BROD

* Ansprechpartner: Ing. CSc. Jan BOUMA, bouma@vubhb.cz

Tabelle 2: Prozentueller Anteil der tschechischen Sorten an der gesamten Vermehrungsfläche zwischen 1997 und 2008

Zuchtgesellschaft	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
SATIVA	23,8	21,1	19,6	13,6	7,7	6,3	6,3	4,9	3,0	2,1		0,8
SELEKTA	6,5	6,8	6,7	7,9	9,5	12,3	12,6	11,7	12,1	12,5		12,1
VESA	3,5	3,7	3,0	2,3	3,1	5,1	5,5	6,5	6,2	7,4		9,6
VYSOČINA	-	-	-	-	0,6	0,4	0,6	0,4	0,6	0,3		0,1
VÚB	-	-	-	-	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1
Insgesamt	33,8	31,6	29,3	23,8	20,9	24,4	25,0	23,5	21,9	22,4		22,7
Kartoffelanbaufläche (ha)	72625	71855	71455	69198	54137	46917	43489	42141	41207	38549	40244	37906
Vermehrungsfläche (ha)	6635	5257	4802	5313	5310	5252	4753	5033	4510	3744	3908	4005
Anzahl vermehrter Sorten	126	107	102	117	119	126	126	145	178	179	199	198

- Selektion des perspektiven Kartoffelmaterials mit einem erhöhten horizontalen Resistenzgrad durch konventionelle Züchtungsmethoden
- Gewinnung der isogenetischen Kartoffellinien mit einem erhöhtem horizontalen Krautfäule-Resistenzgrad
- Überprüfung des Vorkommens von 2n-Gameten in Diploiden aus voriger Lösung mit einem erhöhten Krautfäule-Feldresistenzgrad, die für mitotische Polyploidisierung ausgewählt wurden
- Haploidisierung der Tetraploide mit Hilfe von Parthenogenese bei entfernter Hybridisierung mit *Solanum phureja*-Klonen
- Evaluierung des Knollenmaterials aus 2x x 2x Hybridisierung (2000) aus voriger Lösung und ihre Selektion nach Ploidiestufe
- Evaluierung des Samenmaterials aus 2x x 2x Hybridisierung (2001) aus voriger Lösung und ihre Selektion nach Ploidiestufe unter Bedingungen von natürlichen Phytophthora-Druck.
- Optimierung von Kultivierungsmethoden der Donorpflanzen für Isolierung der aus diesen Pflanzen gewonnenen Protoplasten
- Überprüfung des Regenerationspotenzials der Protoplasten ins Stadium einer intakten Pflanze, Optimierung der Protoplastenfusion in gewählten Kombinationen und Überprüfung der Regenerationsfähigkeit und Protoplastenkultivierung nach der Fusion
- Gewinnung von homozygotischen und genetisch-stabilen Tetraploiden durch mitotische in vitro-Polyploidisierung mit Hilfe von mitotischen Giften im ausselektierten diploiden Material
- Gewinnung von interspezifischen *Solanum tuberosum* x Wildart-Hybriden mit Hilfe vom Material mit unterschiedlichen Ploidiestufen, Durchführung der 4x x 2x Hybridisierung
- Durchführung der Hybridisierung und Gewinnung von Samen aus der 4x x 4x Kreuzung mit Hilfe von Tetraploiden entstanden nach der Applikation von einem mitotischen Gift in der in vitro-Kultur mit Sorten und Material aus der Neuzüchtung

- Charakterisierung der potenziellen gewonnenen somatischen Hybride

Im Rahmen der Projektlösung wurde z.B. der perspektive Hybrid H 27 aus Vesa Velhartice a.s. erzeugt, der im Labor für Gewebekulturen in die in vitro-Bedingungen übertragen, erholt und für weitere Prüfungen und Bewertungen vermehrt wurde. Auch im Jahre 2007 zeigte dieser Hybrid eine höhere Krautfäule-Resistenz als die Sorte Bionta aus, trotz einen hohen Infektionsdruck wurde beim Hybrid bis zum 9.8. kein Phytophthora-Auftreten gefunden, in diesem Termin wurde die Sorte Bionta bedeutend infiziert (Bonitierungsstufe 3).

Im Jahre 2007 wurden aus der Hybridisierung von 19 tetraploiden Regeneranten, die aus diploiden Pflanzmaterial durch mitotische Polyploidisierung mit Hilfe von Toxin der mitotischen Spindel erzeugt wurden (03.46/1 OR 699 4x, 03.53/2 OR 758 4x, 03.96/1 OR 564 4x, 03.109/1 OR 280 4x, 03.47/1 OR 777 4x, 03.47/1 OR 793 4x, 03.47/1 OR 797 4x, 03.47/1 OR 795 4x, 03.80/1 OR 923 4x, 03.80/1 OR 919 4x, 03.80/1 OR 928 4x, 03.80/1 OR 929 4x, 03.70/2 4x, 03.85/1 4x, 03.41/1 4x, 03.109/1 4x, 03.65/2 4x, 03.39/2 4x, 03.96/1 4x) und des von Züchtern ausgewählten Materials von Sativa Keřkov, a.s. - Kariera, V 203/6, V 273/1, V 114/9, V 402/14, Marcela, X 100/11, X 224/3, V 95/3, V 11/1, von Selekt Pacov a.s. - Adéla, Madona, 10/4 und von Vesa Velhartice a.s. - Red Anna, B 26/1, A 54/1, A 26/1, B 98/10, C 122/2, Nancy A 138/2, 440 Samen gewonnen. Insgesamt wurden 1650 Blüten aus 255 Kombinationen angekreuzt, 6 Blüten bildeten Beeren. Drei Kreuzungskombinationen waren erfolgreich 03.85/1 x V 114/9 (35 Samen), 03.85/1 x A 54/1 (345 Samen) und 03.85/1 x V 203/6 (60 Samen).

Im Rahmen der Optimierung von Kultivierungsmethoden der Donorpflanzen für Isolierung der von diesen Pflanzen gewonnenen Protoplasten, Überprüfung des Regenerationspotenzials der Protoplasten ins Stadium einer intakten Pflanze, Optimierung der Protoplastenfusion in gewählten Kombinationen und Überprüfung der Regenerationsfähigkeit und Protoplastenkultivierung nach der Fusion wurden folgende Regeneranzahlen (in einzelner Kombinationen der Protoplastenfusion) erreicht, die in Paare kloniert und bezüglich Ploidiestufe komplett mit flow-cytometry (FC) gemessen wurden:

mit FC gemessen	<i>S. pinnatisectum</i> 8166 + <i>S. tuberosum</i> cv. Bintje	220
	<i>S. pinnatisectum</i> 8166 + <i>S. tuberosum</i> dh 299	58
	<i>S. pinnatisectum</i> PI 320342 + <i>S. tuberosum</i> cv. Ditta	0
	<i>S. pinnatisectum</i> PI 320342 + <i>S. tuberosum</i> cv. Keřkovský rohliček	44
	<i>S. bulbocastanum</i> 8003 + <i>S. tuberosum</i> cv. Bintje	38
	<i>S. bulbocastanum</i> 8003 + <i>S. tuberosum</i> dh 243	297
	<i>S. bulbocastanum</i> PI 243512 + <i>S. tuberosum</i> cv. Ditta	86
	<i>S. bulbocastanum</i> PI 243512 + <i>S. tuberosum</i> cv. Magda	41
	<i>S. bulbocastanum</i> PI 243512 + <i>S. tuberosum</i> cv. Keřkovský rohliček	0
	<i>S. bulbocastanum</i> PI 243512 + <i>S. tuberosum</i> cv. Kordoba	24

Für die Gewinnung interspezifischer *S. tuberosum* x Wildarten-Hybride wurden die Wildarten mit vermutlicher Phytophthora- und Kartoffelkäfer-Resistenz (*S. berthaultii* PI 310925 bezeichnet PS 8/2, *S. bulbocastanum* PI 243512 bezeichnet PS 12/16, *S. pinnatisectum* PI 320342 bezeichnet PS 5/6, *S. verrucosum* PI 161173 bezeichnet PS 16/4) und ihre durch mitotische Polyploidisierung gewonnenen tetraploiden Regenerante (*S. berthaultii* PS 8/2 - OR 3/19, OR8/6, *S. bulbocastanum* PS 12/16 - OR7/14, OR7/19, *S. pinnatisectum* PS 5/6 - OR9/1, OR9/8, *S. verrucosum* PS 16/4 - OR8/20, OR9/19) eingesetzt.

Weiters wurden zur interspezifischen Hybridisierung die durch Parthenogenese oder Androgenese gewonnenen primären *S. tuberosum* Dihaploide und sekundäre *S. tuberosum* Dihaploide eingesetzt. Sie wurden in der Richtung dihaploid *S. tuberosum* (2n = 24, 2 EBN) x *S. bulbocastanum* - nach mitotischer Verdoppelung (2n = 48, 2 EBN), dihaploid *S. tuberosum* (2n = 24, 2 EBN) x *S. pinnatisectum* - nach mitotischer Verdoppelung (2n = 48, 2 EBN), dihaploid *S. tuberosum* (2n = 24, 2 EBN) x *S. verrucosum* (2n = 24, 2 EBN), dihaploid *S. tuberosum* (2n = 24, 2 EBN) x *S. berthaultii* (2n = 24, 2 EBN), tetraploid *S. tuberosum* (2n = 48, 4 EBN) x *S. verrucosum* - nach mitotischer Verdoppelung (2n = 48, 4 EBN), tetraploid *S. tuberosum* (2n = 48, 4 EBN) x *S. berthaultii* - nach mitotischer Verdoppelung (2n = 48, 4 EBN) hybridisiert.

Zu den Experimenten eingesetztes Material entstand aus der Bank von genetischen Ressourcen der Kartoffel, die in Vyzkumny ustav bramborarsky Havlickuv Brod erhalten ist.

Der Hybridisierungserfolg wurde nach Anzahl gebildeter Beeren und gewonnener Samen beurteilt. Die Hybridität der Nachkommen in einer Samengeneration wurde visuell mit morphologischen Merkmalen und RAPD-Technik evaluiert. Primer OPERON TECHNOLOGIES Inc. OPA02, OPA12, OPA16 und Primer UP 3-1, UP 0-3-1 (THIEME et al. 1997) wurden eingesetzt und sie wurden erfolgreich bei der Nachweis von Hybridnachkommen nach somatischer Hybridisierung überprüft. Das Prinzip der Determination basierte auf dem Vergleich von RAPD-Profilen der Nachkommen und Eltern. Jeder Primer wies Art-spezifische Banden in Eltern nach. Bei den Einzelnern, bei denen erfolgreiche Hybridisierung erfolgte, ist das RAPD-Profil eine Kombination von spezifischen Profilen beider Eltern. DNA-Isolierung erfolgte mit Kommerzkit Sigma (GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit). Die Bedingungen für PCR-Reaktion wurden nach THIEME (1997) in Kombination mit Temperaturgradient optimisiert. Elektrophoretische Separierung erfolgte bei 7 V.cm⁻¹, 90 Minuten in 1,5%igen Ethidiumbromid angefärbten Agarose-Gel.

Insgesamt wurden während 3 Jahren 346 verschiedene Elternkombinationen durchgeführt und 4 144 Blüten angekreuzt. Es wurden 95 Beeren gebildet (2,99 %), davon 1367 Samen gewonnen wurden. Das Gewinn pro eine angekreuzte Blüte war 0,33 Samen und pro Beere 14,39 Samen. Das Jahr 2005 zeigte sich als klimatisch wenigsten geeignet zur Kreuzung (hohe Temperaturen) aus und wurde durch geringe Blütenintensität und gesunkene Pollenfertilität charakterisiert.

Gewonnene Ergebnisse des Projekts standen und stehen den Nutzern - Züchtern, Fachleuten in der Form der wissenschaftlichen und fachlichen Publikationen (9), Beiträge aus den nationalen und internationalen Konferenzen (12) und des genetischen Materials (Knollenmaterial für Einbeziehung in die Neuzüchtung - 595 Hybride, Samenmaterial für Einbeziehung in die Neuzüchtung - 440 Samen, Knollenmaterial für Verwenden in anknüpfenden Projekten oder Einlagerung in die in vitro-Genbank - 148 Hybride, Samenmaterial für Verwendung in anknüpfenden Projekten - 941 Samen) zur Verfügung.

Eine andere Priorität für genetische Züchtungsforschung ist die Entwicklung der Kartoffel-Genbank mit Nachdruck auf Konservierung, Erhaltung und Verwertung des Kartoffel-Genofonds zur weiteren Forschungs- und Züchtungszwecken.

Die in vitro-Genbank ist im Rahmen des „Nationalen Programms der Konservierung und Verwertung von Pflanzen-Genofond und Agrobiodiversität“ finanziert. Die Arbeit mit dem Kartoffel-Genofond besteht in Sicherstellung von 6 anknüpfenden Einsätzen - Versammlung und systematische Erweiterung der Kollektion von genetischen Ressourcen der Kartoffel, langfristige und zuverlässige Erhaltung des versammelten Kartoffel-Genofonds und seine Regeneration, systematisches Studium und Charakterisierung der im Kartoffel-Genofond einbezogenen Akzessionen, Dokumentation genetischer Ressourcen der Kartoffel, internationale Kooperation im Feld von genetischen Ressourcen der Kartoffel, Lieferung genetischer Ressourcen und Informationen über das in der Genbank geführten Genofond. Die Kollektion des Kartoffel-Genofonds ist ausschließlich als in vitro-Kultur erhalten. Die Regeneration erfolgt auch in einer in vitro-Kultur. Zur Beurteilung von genetischen Ressourcen ist die Feldstudienkollektion ausgepflanzt, die eine Vorparzelle und eine Arbeitsparzelle einbezieht. Grundsätzliche Evaluierung der Akzessionen erfolgt nach abgestimmter Methodik. Im Jahre 2008 wurden in die in vitro-Genbank 42 Akzessionen neu einbezogen. Durch Kultivierung von knollenbildenden Pflanzen unter in vitro-Bedingungen sind langfristig 2272 Akzessionen erhalten - 1200 *Solanum tuberosum*-Sorten, 406 tetraploide *Solanum*

Tabelle 3: Zwischen 1994 und 2008 wurden 4438 Muster an Nutzer der Kartoffel-Genbank abgegeben

Jahr	Züchter	Forschungs- u. pädagogische Arbeitsstelle	Auslandsnutzer	Sonstige Nutzer	Insgesamt
1994	89	357	13	-	459
1995	76	145	5	-	229
1996	84	96	8	-	188
1997	48	299	39	-	386
1998	37	203	32	-	272
1999	33	344	30	-	407
2000	40	98	3	-	141
2001	68	216	10	-	294
2002	47	98	-	-	145
2003	19	165	7	-	191
2004	8	423	2	2	435
2005	13	203	-	55	271
2006	24	275	-	33	332
2007	7	432	-	33	472
2008	7	189	3	20	219
Insgesamt	600	3543	152	143	4438

tuberosum-Hybride, 249 Dihaploide, 187 Genotypen von 5 Kulturarten, 111 Genotypen von 26 Wildarten und 119 interspezifische *Solanum*-Hybride. Unter Feldbedingungen sind jedes Jahr 119 Mustern von *Solanum tuberosum*-Sorten und tetraploiden *Solanum tuberosum*-Hybriden und 36 vergleichende Sorten evaluiert. Die Passport- und Evaluierungsdaten sind an die IS EVIGEZ übergeben. An Nutzer vom Kartoffel-Genofond sind Daten über laufende Evaluierung der Akzessionen abgegeben und zwar mittels zwei Informativübersichten und eine Liste der erhaltenen Mustern mit Information über Gesundheitsstatus der Akzessionen.

Zwischen 1994 und 2008 wurden 4438 Mustern an Nutzer der Kartoffel-Genbank abgegeben und zwar in Form der Knollen aus der Feldkollektion, als auch Pflanzen aus der in vitro-Genbank (Tabelle 3).

Im Rahmen der Prioritäten von Potato Working Group ECP/GR ist Erhaltung der Akzessionen slowakischer Herkunft in einer Duplikationsversammlung garantiert - 45 Akzessionen. Daten sind laufend für „The European Cultivated Potato Database“ und „The Database for Related Solanum species“ vorbereitet.

Late blight resistance breeding with the potato MT progeny

Bodo Trognitz^{1*}, Friederike Trognitz¹, Felix Fuchs², T. Grahl¹, I. Manrique³ and M. Orrillo³

Abstract

The rapidly increasing genetic sequence information for *Solanum* provides a practical means for the design of potato breeding methods that make use of molecular markers. The tetraploid, heterozygous, and inbreeding-susceptible potato requires appropriate efforts to this end. The MF-II x TPS67 cross progeny carrying novel late blight resistance was phenotyped and genotyped to develop molecular markers for selection for its inherent resistance and to facilitate its utilisation in advanced breeding programmes.

The clonal cultivars MF-II and TPS67 were developed at the International Potato Centre. Trialing them in Austria revealed they produce high yield and possess good late blight resistance (LBR). Therefore, we develop genetic maps and markers to efficiently select for the resistance genes inherent of these genetic resources in breeding. Over 200 markers including SSR, CAPS, RFLP, and several other PCR-based types were screened for informativeness, and framework genetic linkage maps were constructed to locate the resistance. TPS67 appears to carry a single major R locus on chromosome IV and MF-II also segregates for a single locus on chromosome XI. It was not known whether these resistance genes can be

overcome by extant strains of *Phytophthora infestans*, the causal agent of late blight, how frequently the genes are overcome and whether they would display residual resistance once they are broken down. Besides investigating the resistance phenotype within the MT cross progenies, we have commenced the directed search for markers linked to the resistance genes that could be employed in breeding for blight resistance using these parents. PCR primers for syntenic marker loci already mapped in *Solanum* were applied and the amplicons directly subjected to sequencing (when 1 or 2 alleles were present) or treated with restrictases. Allele-specific PCR primers were designed on SNP information. Cleaved amplified polymorphic sequence- (CAPS) markers were developed when restrictases yielded segregating products. With this approach we have developed so far molecular markers linked to the LB resistance of MF-II, the search for markers of close linkage to the resistance gene of TPS67 continues. Closely linked crude markers will then be converted to easy-to-use markers for selection in breeding.

Keywords:

Genetic mapping, Molecular marker, *Phytophthora infestans*, potato, *Solanum tuberosum*

Introduction

Late blight is of large economical importance in potato production and efforts are undertaken to increase the plant resistance by widening the genetic base and investigating the molecular bases of the resistance. Current potato cultivars represent a wide range of resistance in the field that covers intermediate phenotypes between the immunity by some „strong“, intact, race-specific, i.e. „vertical“ R proteins, such as those encoded by Black's R genes (BLACK et al. 1953) and race-nonspecific „horizontal“ levels of reduced susceptibility under field conditions. While breeders dislike the use of R genes due to their vulnerability to the rapidly adapting pathogen populations, it has been clear that today there is no horizontal resistance known that is strong enough to protect a crop.

Modern molecular genetic research has revealed that R genes are in fact involved in all kinds of true resistance, side by side with a large group of genetic elements contributing to pathogen recognition, signaling, and response. The dynamics of pathogen and host and the flexible tactics used by both of these players parallel with some respect a soccer

game with attacking and defending teams and many balls and goals. Therefore it is appropriate to continue research on all elements required for plant resistance, including the R genes, and to identify appropriate means of their sustainable use in the breeding of modern potato cultivars.

Materials and Methods

The tetraploid parental clones MF-II (group tuberosum selection of Indian descent, M. Upadhyya, International Potato Centre, unpublished) and TPS67 (group andigena, described in TROGNITZ 1998) were crossed at CIP, Lima, Peru, and at ARC, Austria, to produce offspring segregating for blight resistance. Plants were maintained pathogen-free in vitro and clonal copies were grown in pots and in the field for several trials. Blight resistance was phenotyped by subjecting the individuals of the MT crosses to detached leaflet tests as was described in TROGNITZ (1998), using, in separate, several *P. infestans* isolates varying for the known avirulences and with simple up to highly complex pathotypes. By analysing the patterns of phenotype response to these isolates of every progeny individual in separate, in

¹ Austrian Research Centers GmbH, A-2444 SEIBERSDORF

² Niederösterreichische Saatbau Gen mbH, Meires 25, A-3841 WINDIGSTEIG

³ International Potato Center, POBox 1558, LIMA, Peru

* Ansprechpartner: Dr. Bodo TROGNITZ, bodo.trognitz@arcs.ac.at

Table 1: Phenotyping and segregation analysis of late blight resistance in the MT population

Genotype group	# expected (Lima)	# observed (Lima)	# expected (Austria)	# observed (A)
total MT plants		861		171
RM RT S(RT)	1	131	2	83
RM RT	1	104	-	
RM + RM S(RT)	2	193	1	53
RT S(RT)	1	100	-	
RT	1	94	-	
r1 rT S + r1 rT s	2	217	1	35
unknown		22		
P (Chi-square test)		n.s.		n.s.
inferred parental genotypes	MF-II	R1 r r r SRT s s s	TPS67	RT r r r

combination with segregation analysis for the entire progeny the characteristics and genetic states of inherent factors controlling the blight resistance were discerned. Observed segregation of resistance was fitted to genetic models by applying chi-square tests to contingency tables.

Genetic mapping of the resistance genes was performed using PCR-based markers of various types according to standard protocols. The mapping calculations were done in TetraploidMap (HACKETT and LUO 2003).

The *S. demissum* R1 gene conferring resistance to late blight was searched for with the PCR primers 76-2sf2 and 76-2SR developed by BALLVORA et al. (2002).

Results and Discussion

Determination of resistance factors by segregation analysis

Phenotyping of 861 MT cross segregants at Lima allowed for the distinction of two major R factors, RM from MF-II and RT from TPS67, and an unknown factor from MF-II that suppressed the resistance conferred by RT only in presence of specific *P. infestans* isolates (Table 1).

Attempts to detect these genetic elements of blight resistance on a population of 171 individuals phenotyped in Austria led to the tentative identification of plants carrying RM and RT, whereas the suppressor of RT (SRT) could not be observed due to absence of *P. infestans* isolates that invoked its action (Table 1, bottom).

In Austria, 80 progenies of the MT cross (by their inferred resistance genotype; 30 RT., 30 RM rT., 20 rM rT) were

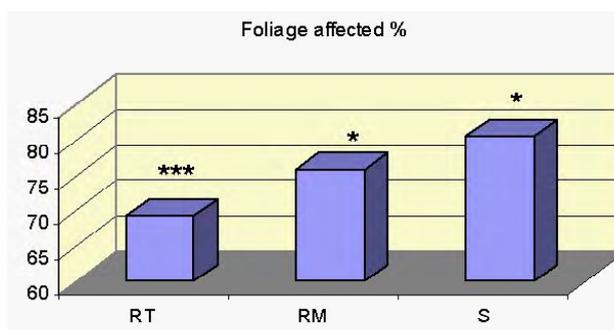


Figure 1: Effect of R phenotype on LB resistance in the field. Field trial 2005, Meires, Austria. Population MF-II x TPS67 80 progeny (30 RT, 30 RM, 20 S) no fungicide, natural infestation, average of 3 disease readings, percent foliage area affected on 10-plant-plot. * = P<0.05, * = P<0.001 (t-test and analysis of variance).**

trialed in the field, at Meires, Waldviertel. In a trial in 2003, blight did not develop due to the dry and exonerably warm climate. In a second trial in 2005, using a complete block design with two replications of plots of 10 plants, foliar resistance was determined by the inherent resistance. Although *P. infestans* occurring at the trial site was able to overcome both R genes, both genes developed considerable residual effects that contributed significantly to the resistance observed (Figure 1).

A small albeit highly significant residual resistance effect of these two R genes was also measured in the detached leaflet assays using various *P. infestans* isolates as described above. Therefore, the usefulness of the two R genes even when they are overcome by the pathogen, is evident.

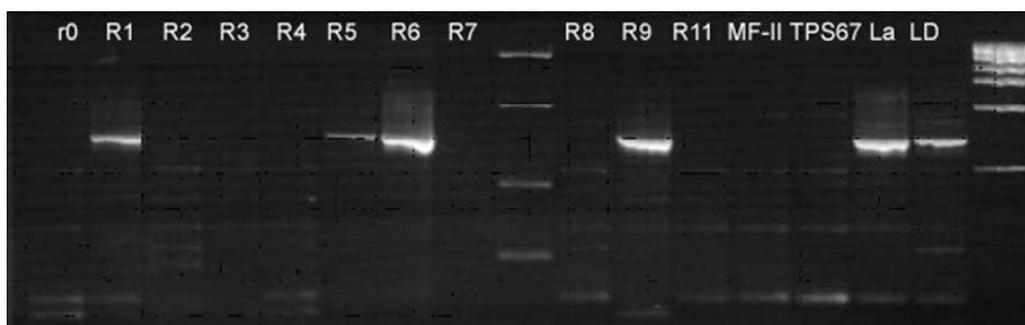


Figure 2: Amplification of the potato (*S. demissum*) R1 allele conferring resistance to *P. infestans* carrying Avr1, with allele-specific primers 76-2sf2 and 76-2SR (BALLVORA et al. 2002). The R1-fragment is absent in MF-II and TPS67, but present in R1, R5, R6, R9, La (Laura) and LD (Linzer Delikatess).

Experiments to determine the identity of RM and RT with known R genes

PCR amplification on total DNA from the parental clones MF-II and TPS67 with primers specific for the potato R1 gene (Ballvora et al. 2002) did not produce a product (Figure 2) indicating that none of the R genes in the MT population is R1. From the isolates of *P. infestans* used and their virulences we had already inferred that other known R genes were not identical with RM and RT. Therefore, it is likely that both genes are additional to those of the Black's series of R genes.

Genetic mapping of RM and RT

Over 200 PCR primers were tested to obtain markers segregating in the MT population and to construct a raw framework map. The resulting linkage groups were assigned to the consensus Solanum chromosomes by markers derived from consensus sequence (COS II) markers as displayed at the SOL genomics network site; http://www.sgn.cornell.edu/markers/cosii_markers.pl. Resistances RM and RT were applied as qualitative genetic markers on this framework map. RT was mapped to chromosome IV (not shown), whereas RM resides on chromosome XI (Figure 3).

Unfortunately, none of the markers found to be linked to the resistance genes segregating in the MT population can be immediately used for marker assisted selection. All markers detected occur in duplex or even triplex and the majority are linked in repulsion to the allele conferring resistance. Therefore, marker fragments are presently cloned and se-

quenced to develop simplex marker alleles that are linked in coupling to the resistance. When these new marker primers will be available they will be tested in the MT population and descendants thereof as soon as these will be generated by the breeder.

Conclusions

Two novel R genes conferring resistance to late blight have been detected in tetraploid potato accessions and they can be used in breeding and varietal selection. We have demonstrated that these genes even when broken down bring about a residual but significant contribution to resistance in the field. Therefore, these R genes are useful for the enhancement of blight resistance in present time and they can be used in breeding.

Molecular markers for use in selection for these resistance genes are being developed and selection by markers can complement or perhaps even substitute the time-consuming, chance dependent „classical“ selection entirely by the phenotype.

Acknowledgements

This work was supported by the BIOEXPLOIT project (6th framework programme, European Commission, FOOD-CT-2005-513959).

References

BALLVORA, A., M.R. ERCOLANO, J. WEISS, K. MEKSEM, C.A. BORMANN, P. OBERHAGEMANN, F. SALAMINI and C. GEBHARDT, 2002: The R1 gene for potato resistance to late blight

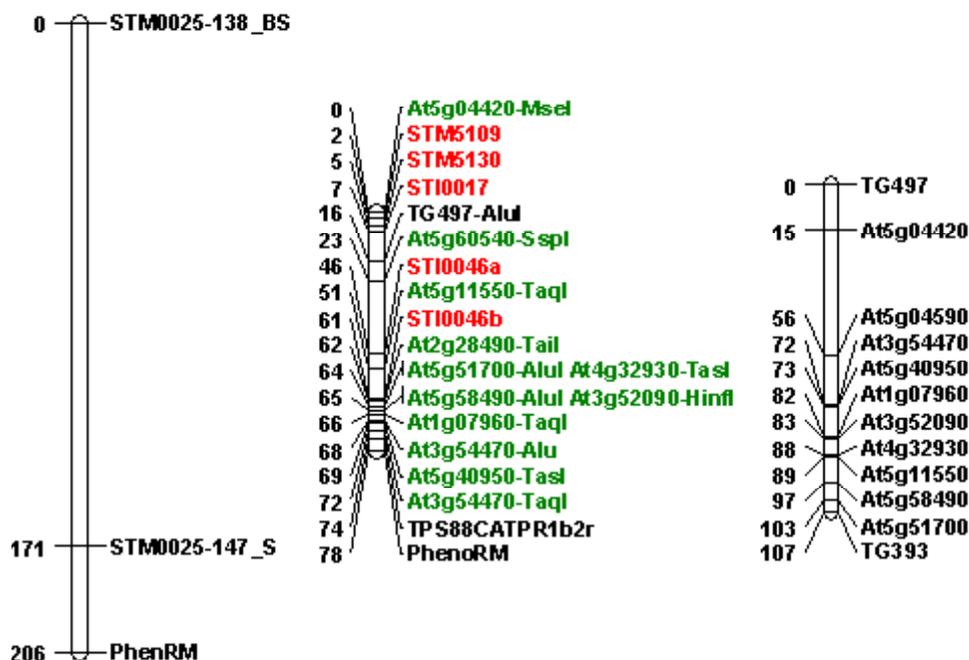


Figure 3: Map of Chromosome XI for the MT population and localization of the novel gene *Rpi-tbrM1* conferring resistance to late blight. Left; framework map, the resistance marker is indicated as PhenRM. Right; corresponding region of the tomato chromosome XI and location of COS II markers. Centre; planned enrichment of the MT framework map with COS II-derived and other markers.

- (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J* 30: 361-371.
- BLACK, W., C. MASTENBROEK, W.R. MILLS and L.C. PETERSON, 1953: A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica* 2: 173-178.
- HACKETT, C.A. and Z.W. LUO, 2003: TetraploidMap: Construction of a linkage map in autotetraploid species. *J Heredity* 94: 358-359.
- TROGNITZ, B.R. 1998: Inheritance of resistance in potato to lesion expansion and sporulation by *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol* 47: 712-722.

Interaction between potato and the endophyte *Burkholderia phytofirmans*

Friederike Trognitz^{1*}, Katja Scherwinski¹, Agnes Fekete², Silvia Schmidt³, Leo Eberl³,
 Jan Rodewald¹, Michael Schmid⁴, Stephane Compant¹, Anton Hartmann⁴,
 Philippe Schmitt- Kopplin², Bodo Trognitz¹ and Angela Sessitsch¹

Keywords

Endophyte, potato, N-acylhomoserine lactones, plant growth promotion, plant gene expression

Introduction

Bacterial endophytes have been defined as „bacteria, which for all or part of their life cycle invade tissues of living plants and cause unapparent and asymptomatic infections entirely within plant tissues, but cause no symptoms of disease“ (WILSON 1995). Endophytes colonize a similar ecological niche as plant pathogens and may gain entry into plants by a number of mechanisms (reviewed by STURZ et al. 2000). Strain PsJN forms endophytic and epiphytic populations when co-cultured with potato (FROMMEL et al. 1991), tomato (PILLAY and NOWAK 1997), or grapevines (COMPANT et al. 2005). The bacterium not only stimulates plant growth (AIT BARKA et al. 2000, BENSALIM et al. 1998, FROMMEL et al. 1991, LIU et al. 1995, PILLAY and NOWAK 1997), it also induces developmental changes (FROMMEL et al. 1991), leading to better water management (LAZAROVITS and NOWAK 1997) and enhanced resistance to a low level of potato pathogens (RICHARDS 1997, STEWART 1997). Despite the fact that strain PsJN promotes plant growth of many different plant species, it has been repeatedly observed that plant performance greatly varies between different cultivars (CONN et al. 1997, PILLAY and NOWAK 1997, BENSALIM et al. 1998).

N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) are produced by a range of Gram-negative bacteria and are used to regulate expression of various genes in a cell-density dependent manner. This phenomenon is known as quorum sensing (QS) and is frequently found in plant-associated bacteria including pathogens. The structures of AHLs vary in the chain length of their acyl chain and chain lengths of 4-16 carbon atoms (EBERL 1999). The principal aim of this study was to study the molecular interaction between the plant and microbial genotype as well as to study the effect of AHLs.

Two, closely related, AHL-producing *B. phytofirmans* strains were selected and inoculated on two potato varieties, which respond differently to strain PsJN. Furthermore, a derivative of strain PsJN was included, which contains a lactonase gene and which showed reduced AHL production. In addition to determining the effect of bacterial inoculation

on plant growth, gene expression was analyzed by using an EST-based microarray targeting more than 4000 potato sequences. Results clearly showed a different response of the two varieties to the microbial inoculation treatments, particularly to a PsJN derivative containing a lactonase gene indicating that the composition and abundance of AHLs modulate cultivar specific plant responses.

Material and Method

Analysis of N-acyl-L-homoserine lactones by UHPLC and FT/ICR-MS

For the analysis of AHLs, the strains were inoculated in 50 ml of Nutrient Broth (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and 50 ml of M9 medium containing tryptophane and grown at 30°C and 175 rpm overnight. Bacteria were harvested at 5000 g and 4°C for 5 minutes and the supernatant was used for AHL extraction. Ultra-high high pressure liquid chromatography (UHPLC) and Fourier transform ioncyclotron resonance mass spectroscopy (FT/ICR-MS) was applied for the analysis of AHLs as described previously (FEKETE et al. 2007).

Quenching of AHL-mediated signalling in B. phytofirmans PsJN

To determine the role of AHL-mediated signalling in *B. phytofirmans* PsJN we employed a quorum quenching approach as described by WOPPERER et al. (2006).

Plant experiments

Two potato varieties were selected for inoculation treatments. *Solanum tuberosum* cv Bionta is an Austrian cultivar highly resistant to potato virus Y, *Phytophthora infestans* and to *Globodera rostochiensis* race 1, but susceptible to wart. *S. tuberosum* cv Russet Burbank is a mutant of Burbank (USA variety) and highly susceptible to potato viruses, *Erwinia* and *Phytophthora infestans* but resistant to *Streptomyces scabies* and *Synchytrium endobioticum* (<http://www.euro-potato.org/menu.php>).

For the in vitro inoculation of explants, bacterial inoculum was prepared according to CONN et al. (1997). In brief,

¹ Austrian Research Centers GmbH-ARC, Dept. of Bioresources, A-2444 SEIBERSDORF

² Helmholtz Centre Munich, Inst. of Ecological Chemistry, D-85764 NEUHERBERG

³ University of Zurich, Dept. of Microbiology, CH-8008 ZURICH

⁴ Helmholtz Centre Munich, Dept. of Plant-Microbe Interactions, D-85764 NEUHERBERG

* Ansprechpartner: Ph.D. Friederike TROGNITZ, friederike.trognitz@arcs.ac.at

from an overnight culture bacterial cells were collected and resuspended in PBS buffer to obtain 10^8 cfu/ml. Nodal explants were immersed in the bacterial solution for 15 sec and then placed in the test tubes containing MS medium (MURASHIGE and SKOOG 1962) supplemented with 0.8% agar and 1% saccharose. Control plantlets were inoculated with PBS buffer. For the gene expression experiments plants were collected 18 days after inoculation. A second experiment was performed in the same manner to measure plant growth parameters after two months.

RNA isolation, cDNA microarray construction and hybridization protocols are deposit at the NCBI GEO server under the following ArrayDesign name: RLP array Version I; ArrayExpress accession: GPL7326 and GSM322635 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Results and Discussion

Characterization of bacterial strains and effects on plant growth

AHL analysis revealed that the quorum sensing signals produced by both strains include O-C14-HSL, OH-C14-HSL and OH-C12-HSL, whereas strain PsJN produced in addition OH-C8-HSL. Strain PsJN-*aiiA* carrying a lactonase gene shows reduced production of OH-C14-HSL, however, the production of other AHL compounds was not affected.

Both *B. phytofirmans* wildtype strains increased plant growth in Russet Burbank, whereas no significant effects were determined for the variety Bionta. Strains PsJN and RG6-12 promoted the shoot length of Russet Burbank (Figure 1), but shoot weight was only significantly increased by strain RG6-12. Russet Burbank inoculated with PsJN showed reduced root length. Strain PsJN-*aiiA* showed no

effect on shoot production, however, caused inhibited root production of Russet Burbank (Figure 1).

Microarray-based expression analysis

Both cultivars were inoculated either with strain RG6-12, PsJN or with its derivative PsJN-*aiiA*. The gene expression data of inoculated treatments were compared to those of non-inoculated controls. In Table 1 are the numbers of up- or down-regulated gene in each cultivar. In Russet Burbank a total number of 530 genes were differentially regulated ($P < 0.0001$) comprising a higher number of down-regulated genes than up-regulated ones. In Bionta only 209 genes were differentially regulated comprising a higher number of up-regulated genes than down-regulated ones. In both cultivars the treatment with strain RG6-12 had the lowest impact on gene expression change. Each plant genotype showed a rather unique response to strain PsJN-*aiiA*, whereas more genes were up- or down-regulated in both cultivars after inoculation with the wild-type strains. About hundred genes were significantly down-regulated in Russet Burbank, but up-regulated in Bionta due to strain PsJN-*aiiA*.

The expression change was clustered using K means clustering algorithm. In total 6 clusters were obtained which represent the differences between the genotypes and the effect of the AHLs. Figure 2 shows the mean expression of the clustered genes. In cluster 3 are most genes which were down regulated in Russet Burbank and up regulated in Bionta. The genes belong to various functional categories like cell rescue and defense and cell cycle/DNA processing. One gene down regulated in Russet Burbank and up regulated in Bionta are a calmodulin like gene, which were found to be involved in gene silencing in tobacco (ANANDALAKSHMI et al. 2000). The involvement of this gene in the endophytic plant interaction was proved by real time PCR. Several defense related genes were up

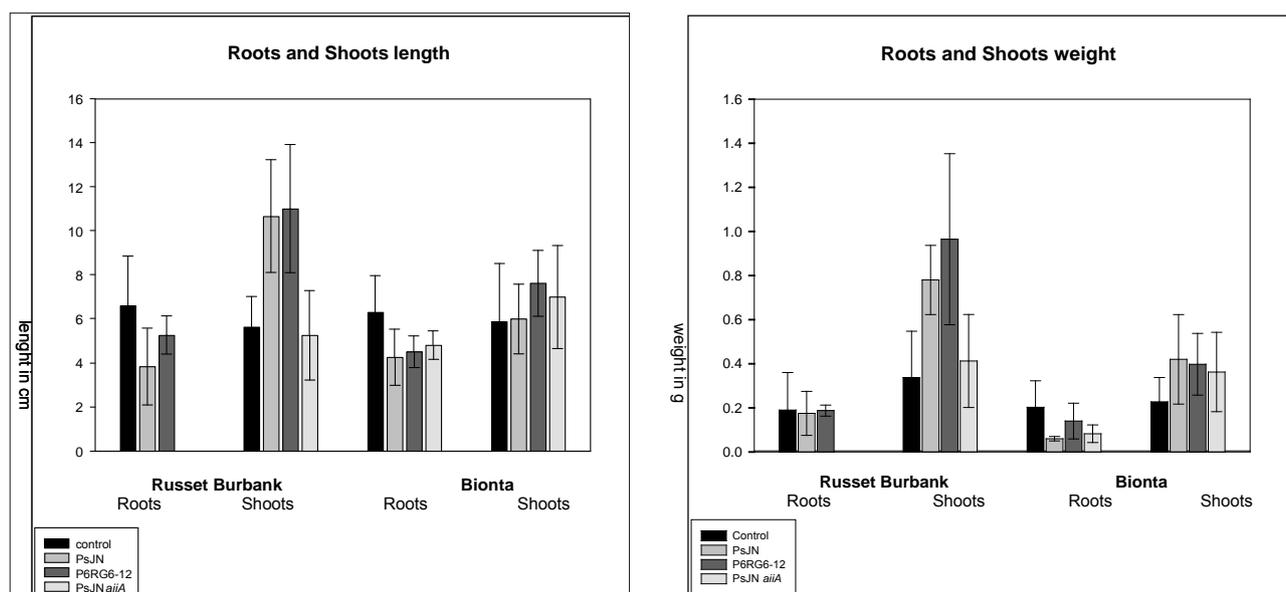


Figure 1: Root and shoot length (A) and weight (B) of plantlets after inoculation with strains PsJN, RG6-12 and PsJN-*aiiA* or not inoculated

Table 1: Number of significantly ($P > 0.0001$) up- or down-regulated genes of Russet Burbank and Bionta in the same treatment, ▲ up-regulated, ▼ down-regulated

	Russet (▲/▼)	Burbank	Bionta (▲/▼)	in both cultivars (▲/▼)	Russet Burbank ▲ AND Bionta ▼	Russet Burbank ▼ AND Bionta ▲
RG6-12	33/178		6/13	6/0	0	1
PsJN	81/159		67/33	22/8	0	9
PsJN- <i>aiiA</i>	56/225		135/17	4/2	7	106

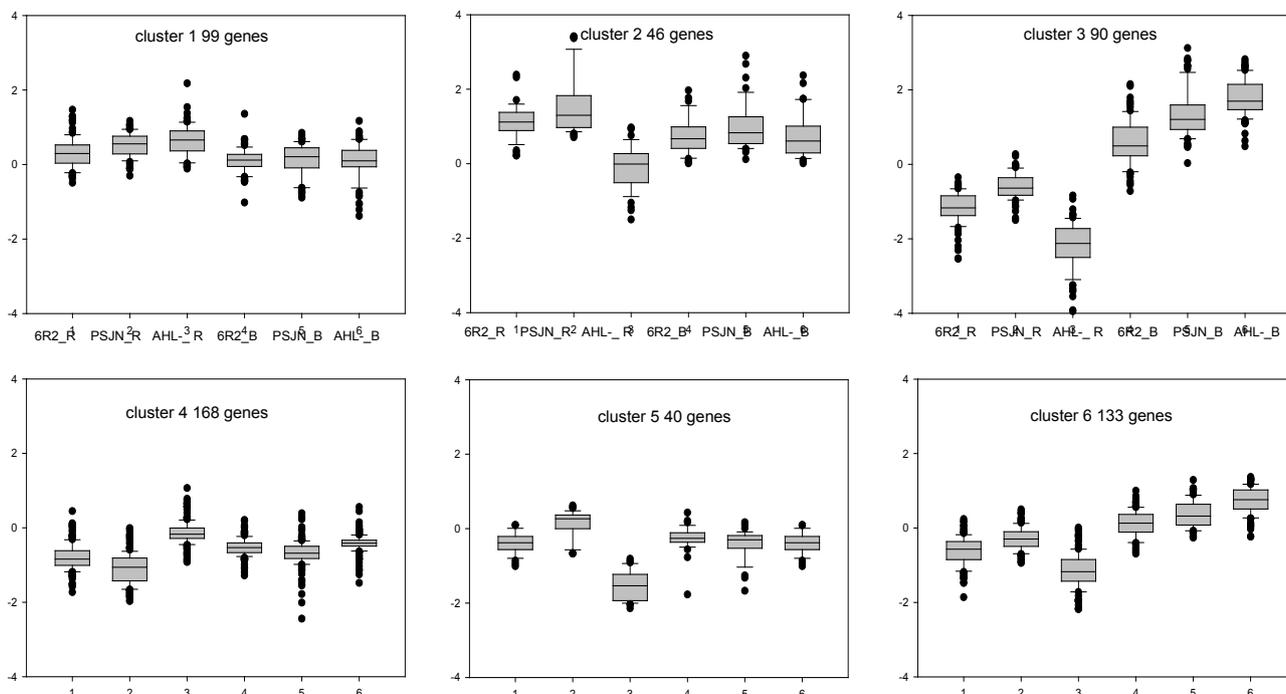


Figure 2: K means cluster analysis of differentially expressed gene among the 6 treatments, 6R2_R (Russet Burbank PR6-12, PsJN_R Russet Burbank PsJN, AHL_R Russet Burbank PsJN-*aiiA*, 6R2_B (Bionta PR6-12, PsJN_B Bionta PsJN, AHL_B Bionta PsJN-*aiiA*)

regulated in Russet Burbank but down regulated in Bionta. To this group belong (cluster 2, *Figure 2*) several proteinase inhibitors, P450 hydroxylase, PR4, lipoxygenase. For this group of genes no significant change was observed in Bionta. Jasmonic acid (JA) is a key signal molecule for these group of genes. Therefore we propose that JA plays a central role in the endophytic plant interaction for plant growth promoting. Several genes involved in photosynthesis were down regulated in Russet Burbank but up regulated in Bionta (cluster 4, *Figure 2*).

The up regulation of defense genes and down regulation of photosynthesis genes by bacteria has been reported previously (CARTIEAUX et al. 2003, ZOU et al. 2005). ZOU et al. (2005) suggested that the down-regulation could be a consequence of a hypersensitive response induced by ROS or localized apoptosis. Down-regulation of photosynthesis and metabolism genes is likely to be only a transient effect needed for the production of other transcripts necessary for the conditions of colonization (CARTIEAUX et al. 2003). In Bionta the up-regulation of defense related genes and down-regulation of photosynthesis genes was also seen but in a less pronounced manner. Our results suggest that in endophyte-plant interactions the beneficial effect may

partly depend on the magnitude of the gene expression, but that bacterial colonization is not inhibited by defense mechanisms. In all our experiments, strain PsJN showed efficient endophytic colonization throughout the plant.

Strain AHL-*aiiA* with the quenching of the QS signal OH-C14-AHL had a great impact on the gene expression in both cultivars. In Russet Burbank plant growth was reduced and 166 genes were exclusively down regulated by strain AHL-*aiiA*, whereas only five genes were down regulated in Bionta. Moreover, 106 genes down regulated in Russet Burbank were up regulated in Bionta. Most of these genes are defense-related genes and include a range of transcription factors, late embryogenesis-like genes, phenylalanine ammonia-lyase, Avr9/Cf-9 rapidly elicited proteins, calmodulin-like proteins, a cytochrome P450 encoding gene, a WD repeat 33 protein and stress-induced proteins. A range of PR proteins, ethylene and auxin-sensitive protein, cell wall peroxidase, endochitinase, NDR1, glutaredoxin, WRKY transcription factors and several other wound- and stress-induced genes. Genes specifically up-regulated by strain PsJN-*aiiA* include a MYB111 transcription factor, an expansin precursor, a Kunitz-type trypsin inhibitor, an auxin-inducible protein and jasmonate O-methyltransferase

(cluster 3, 5, 6 *Figure 2*). The highly distinct response of both cultivars to PsJN-*aiiA* suggest that AHLs themselves or microbial metabolites which are produced under the control of quorum sensing play an important role in the interaction with plants and seem to steer beneficial effects.

In conclusion, our study showed that two plant cultivars may respond in a very different and specific manner to growth-promoting bacterial strains and that even highly related microbial genotypes have different effects or induce different responses. Detailed analysis of plant gene expression at several time points after inoculation with wild-type strains as well as with knock-out strains being impaired in the production of AHLs, siderophores, IAA, lipid polysaccharids and other features will give more insight in the interaction of plants with plant growth-promoting bacteria.

References

- AIT BARKA, E., A. BELARBI, C. HACHET, J. NOWAK and J.C. AUDRAN, 2000: Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* L. co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 186:91-95.
- ANANDALAKSHMI, R., R. MARATHE, X. GE, J.M. HERR Jr., C. MAU, A. MALLORY, G. PRUSS, L. BOWMAN and V.B. VANCE, 2000: A Calmodulin-Related Protein That Suppresses Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* 290, 142-144.
- BENSALIM, S., J. NOWAK and S.K. ASIEDU, 1998: A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. *Am J Potato Res* 75:145-152.
- CARTIEAUX, F., M.-C. THIBAUD, L. ZIMMERLI, P. LESSARD, C. SARROBERT, P. DAVID, A. GERBAUD, C. ROBAGLIA, S. SOMERVILLE and L. NUSSAUME, 2003: Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. *The Plant Journal* 36, 177-188.
- COMPANT, S., B. REITER, A. SESSITSCH, J. NOWAK, C. CLEMENT, and E. AIT BARKA, 2005: Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* 71:1685-1693.
- CONN, K.L., J. NOWAK and G. LAZAROVITS, 1997: A genotobiotic bioassay for studying interactions between potatoes and plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol* 43:801-808.
- EBERL, L. 1999. N-acyl-homoserinelactone-mediated gene regulation in Gram-negative bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 22:493-506.
- FEKETE, A., M. FROMMBERGER, M. ROTHBALLER, X. LI, M. ENGLMANN, J. FEKETE, A. HARTMANN, L. EBERL and P. SCHMITT-KOPPLIN, 2007: Identification of bacterial N-acylhomoserine lactones (AHLs) with a combination of ultra-performance liquid chromatography (UPLC), ultra-high-resolution mass spectrometry, and in-situ biosensors. *Analyt. Bioanalyt. Chem.* 387:455-467.
- FROMMEL, M.I., J. NOVAK, and G. LAZAROVITS, 1991: Growth enhancement and developmental modification of in vitro potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96:928-936.
- LAZAROVITS, G. and J. NOWAK, 1997: Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *HortScience* 32:188-192.
- LIU, L., J.W. KLOEPPER and S. TUZUN, 1995: Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host-resistance on protection and root colonization. *Phytopathol.* 85:1064-1068.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15, 473-479.
- PILLAY, V.K. and J. NOWAK, 1997: Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Can J Microbiol* 43:354-361.
- STURZ, A.V., B.R. CHRISTIE and J. NOWAK, 2000: Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Pl. Sci.* 19:1-30.
- WILSON, D., 1995: Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73:274-276.
- WOPPERER, J., S.T. CARDONA, B. HUBER, C.A. JACOBI, M.A. VALVANO and L. EBERL, 2006: A quorum-quenching approach to investigate the conservation of quorum-sensing-regulated functions within the *Burkholderia cepacia* complex. *Appl Environ Microbiol.* 72:1579-87.
- ZOU, J., S. RODRIGUEZ-ZAS, M. ALDEA, M. LI, J. ZHU, D.O. GONZALES, L.O. VODKIN, S. DELUCIA, S. and S.J. CLOUGH, 2005: Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. *Mol. Plant Microbe Interaction* 18, 1161-1174.

Selektionstechnologie für resistente Kartoffelsorten mit ausgeprägter industrieller Verarbeitungsneigung

Günter Brader^{1*}, Friederike Trognitz¹, Felix Fuchs², Alexandra Weilharter¹ und Bodo Trognitz¹

Abstract

Technology for selection of resistant potato cultivars with processing quality

Important factors for potato breeding are quality, size and color of tubers as well as resistance to late blight, abiotic stresses and processing quality (e.g. chips, starch quality and amount). A breeding program where expression of marker genes is observed shall be used as basis for a faster and more effective selection program. For this purpose a microarray presented here was developed. The microarray contains 5322 elements representing 4331 different cDNAs. Each element is represented twice on the 11200 dot microarray. The cDNAs of the microarray are derived from a library of *Phytophthora infestans* infected leaves of the potato cultivar Yungay and are selected from the TIGR EST collection or are specifically amplified with PCR on the base of a database entry. The microarray is specifically enriched for elements in defense, light, photoperiod, stress, hormone, signaling, starch-and tuber development.

Keywords: Microarray, potato resistance breeding, *Solanum tuberosum*

Einleitung

Bedeutsam für die Züchtung und Weiterentwicklung von Kartoffelsorten sind eine Reihe wichtiger Faktoren. Neben Ertrag, Form und Farbe der Kartoffel spielen für künftige Weiterentwicklungen Resistenz und Toleranz gegen biotische (z.B. Krautfäule (*Phytophthora infestans*) und abiotische Faktoren sowie die industrielle Eignung bezüglich Stärkeertrag und -qualität und Verarbeitungseignung für Chips und Pommes frites eine wesentliche Rolle.

In der klassischen Kartoffelzüchtung erfolgt die Selektion anhand phänotypischer Merkmale. Diese zeit- und arbeitsaufwendigen Methoden können mit Hilfe molekularer Marker beschleunigt und vereinfacht werden. Im vorliegenden Projekt sollen die effizientere und objektivere Selektion mit Hilfe von spezifisch exprimierten Schlüsselgenen erfolgen. Das Auffinden dieser Gene soll mit Hilfe eines am ARC entwickelten Microarraychips erfolgen. Im Folgenden soll die Zusammensetzung und Aufbau des Microarrays beschrieben werden. Dieser Microarray ist speziell für die Anwendungen Stress/Krautfäuleresistenz sowie Stärke-

stoffwechsel und Knollenbildung ausgerichtet und kann bei Bedarf erweitert werden.

Methoden und Ergebnisse

Microarrayvorbereitung

E. coli mit cDNA Klonen aus Kartoffel in den Plasmiden pCMVSPORT, pBlueScript-SK und pSC-A wurde auf Luria Bertani Medium mit Kalium, Phosphat und Magnesiumzusatz in Platten (96) kultiviert. Das Medium enthielt darüber hinaus 200 mg/L Ampicillin sowie 4.4% Glycerol. Nach 24h Wachstum bei 37°C und Schütteln bei 200rpm wurden jeweils 100µL zur Konservierung direkt eingefroren.

Diese cDNA-Kollektionen dienten als Vorlage für die Polymerasekettenreaktion (PCR). Dazu wurden jeweils 0.5µL in 50µL PCR-Reaktionsgemisch pipettiert und T3/T7 bzw. M13-20/T7 (pCMVSPORT) Primer zur Vermehrung der klonierten Gene eingesetzt. Die Produkte wurden auf Reinheit, Länge und Konzentration untersucht. Saubere Produkte mit Kettenlänge >350bp wurden in 384 Platten getrocknet und mit Hilfe eines Omnigridd Arrays in Pipettierlösung auf Microarray-Glasplatten aufgetragen (Gesamt 11200 dot array). Jede Sonde wurde dabei in zwei Wiederholungen aufgetragen. Zusätzlich zu den in der nächsten Sektion beschriebenen Sonden enthält der Microarray 18 Kontrollen, die in 48 Wiederholungen auf den Microarray aufgetragen wurden.

Auswahl der Sonden für den Microarray

Die Sonden für den Microarray wurden anhand folgender Kriterien ausgewählt:

Klonierte, exprimierte Sequenzen (ESTs) aus einer cDNA Bibliothek, die aus mit *Phytophthora infestans* behandelten Blättern der Kartoffelsorte Yungay stammt. Diese mit Krautfäule infizierten Pflanzen haben Boten RNA, die für die Verteidigung wichtig sind bzw. spezifisch bei Infektion eingeschaltet sind, angereichert. Aus der normalisierten cDNA Yungay Bibliothek wurden 3475 Klone sequenziert und für den Microarray Chip verwendet.

1645 cDNA Klone der Kartoffelsorten Kennebec und Binjite wurden aus Sammlungen des Institutes für Genomforschung (TIGR) ausgewählt. Die cDNAs stammen aus folgenden Bibliotheken: ruhende Knollen, Stolone, keimende Augen, *P. infestans* infizierte Blätter, Wurzeln, abiotischer Stress, Kallus sowie gemischte Bibliotheken. Die TIGR Sammlung wird im Arizona Genomics Institute (AGI) aufbewahrt und

¹ Austrian Research Centers GmbH - ARC, Biogenetics-Natural Resources Division, Bioresources Department, A-2444 SEIBERSDORF

² NÖ Saatzüchtergenossenschaft, Meires 25, A-3841 WINDIGSTEIG

* Ansprechpartner: Dr. Günter BRADER, guenter.brader@arcs.ac.at

Tabelle 1: Spezifisch für den Stärke/Stressmicroarray zusätzlich ausgewählte Sonden

Kategorie	Unterkategorie	Gesamt	Anzahl der Klone Unterkategorie
Hormon- und Signalkomponenten		269	
	Jasmonsäure		32
	Ethylen		29
	Salicylsäure		8
	Abscisinsäure		43
	Zytokinin		30
	Gibberellin		24
	Brassinosteroid		28
	Auxin		57
	Polyamin andere		9 9
Sekundär und Stickstoffstoffwechsel		121	
	Stickstoffstoffwechsel Sekundärstoffwechsel		40 81
Stärkebiosynthese/regulatoren		237	
	Stärke metabolismus		124
	Stärkeregulatoren (Literatur) Stärkeregulatoren (Co-expression)		35 78
Knollen-, Blütenbildungsregulatoren		57	
Gesamt		684	

die ausgewählten Klone von dort bestellt. Als Auswahlkriterien dienten zunächst annotierte Gene, die eine Rolle in Resistenz sowie Licht- und Photoperiodenkontrolle spielen. Darüber hinaus wurden ESTs ausgewählt, die Homologien

zu Arabidopsis Genen zeigen (min. BLAST, < e-5), die in die in *Tabelle 1* ausgewiesenen Kategorien involviert sind. Zusätzlich sind in dieser Tabelle einige spezifische Kartoffelgene speziell aus dem Sekundärmetabolismus angeführt.

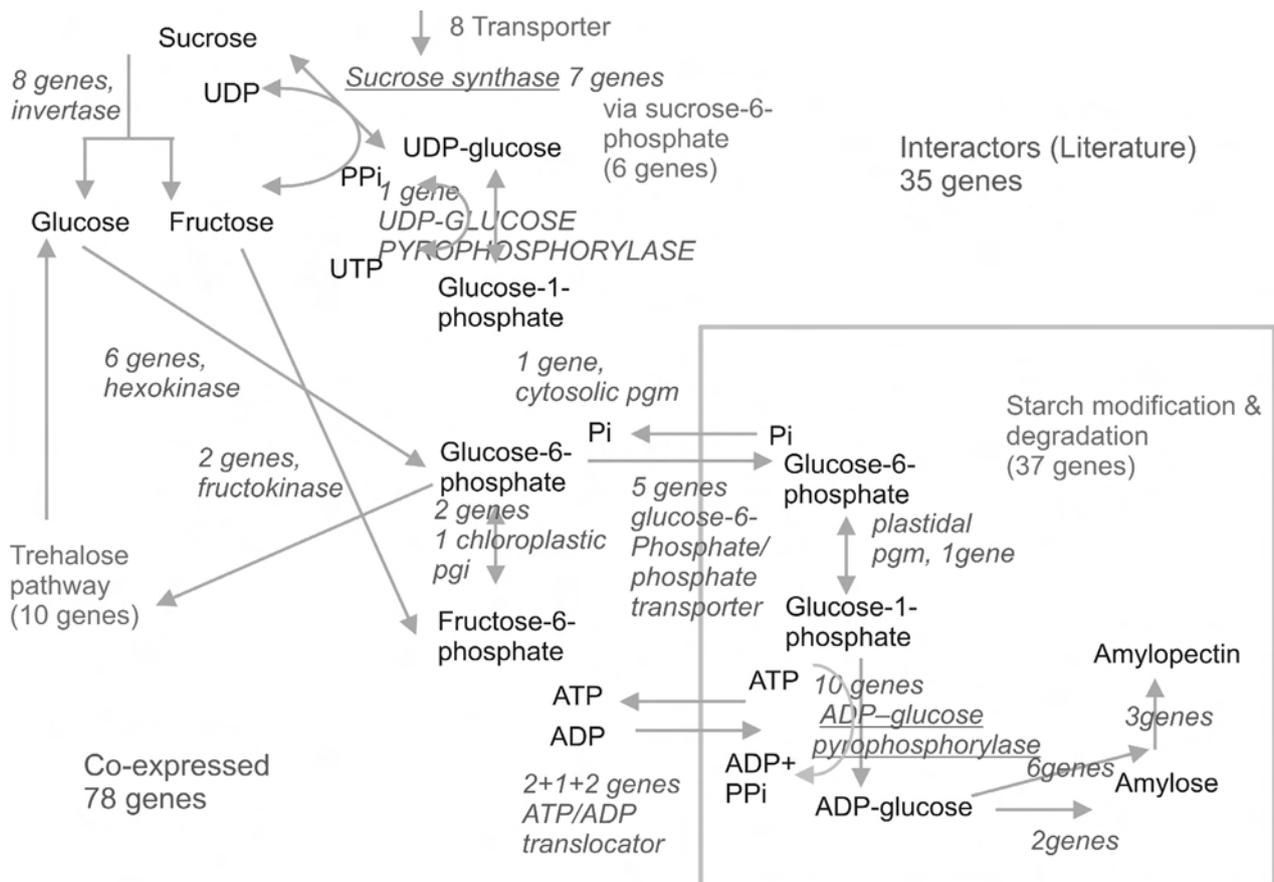


Abbildung 1: Ausschnitt aus dem Stärkestoffwechsel mit Anzahl der auf dem Microarray vorhandenen Gensonden

Die Auswahlkriterien wurden anhand der Literatur sowie anhand der Gene Ontology-(GO-) Annotierungen getroffen. Ein Teil des Stärkestoffwechsels mit der Anzahl der auf dem Microarray vorhandenen Sonden ist in *Abbildung 1* illustriert. Die Stärkestoffwechselwege wurden den Publikationen von BURRELL (2003), FERNIE et al. (2002), GEIGENBERGER (2003), KLOOSTERMAN et al. (2005) und LYTOVCHENKO et al. (2007) entnommen.

Zusätzlich zu bekannten Genen des Stärkestoffwechsels wurden einige Sonden anhand von Co-expressionsdaten mit regulierten Genen des Stärkestoffwechsels ausgewählt. Dazu wurden 228 Microarrayexperimente ausgewählt, an denen aufgrund der gewählten Bedingungen (Behandlung mit Zuckern, variierende Stickstoff- und Phosphatkonzentrationen, Kälte, Tageslängenänderung) Variation in der Expression von Genen des Stärkestoffwechsels zu erwarten sind. Die Affymetrix Microarraydaten wurden in R (Bioconductor Projekt) mit Robust Multichip Average (RMA) normalisiert und ausgewählte, regulierte Gene als Köder (bait) zur Pearson-Korrelationsberechnung verwendet. Insgesamt wurden hier 78 zusätzliche Sonden mit einer Pearson-Korrelation von >0.8 ausgewählt. Als Beispiel seien hier in *Tabelle 2* jene Gene, die ein ähnliches Expressionsmuster wie das Stärkeverzweigungsenzym (SBE2.1) aufweisen. Hingewiesen sei hier auf die mit einem Stern markierten Gene, die anhand der Co-expressionsanalyse gefunden wurden, die aber auch bekannte Gene des Stärkestoffwechsels sind und daher die Methode validieren.

116 Gene, die zwar aus Kartoffel EST Datenbanken bekannt sind, aber entweder in den bestellten ESTs nicht vermehrt werden konnten oder aus anderen EST Bibliotheken stammen, wurden mit PCR aus einer gemischten Stress-cDNA Bibliothek vermehrt und in pSC-A geklont. Darüber hinaus wurden 19 potentielle R-Gen Fragmente mit PCR vermehrt, geklont und in den Microarray aufgenommen.

18 Kontrollen wurden in den Microarray in zumindest 48 Wiederholungen aufgenommen. Diese beinhalten 9

Haushaltsgene der Kartoffel, DNA-freies Pufferreaktionsgemisch sowie DNA-Fragmente die zur Microarraystandardisierung verwendet werden. Insgesamt sind zurzeit 5322 Sonden, die 4331 unterschiedlichen cDNAs entsprechen, auf dem Microarray vorhanden.

Ausblick

Ob und in welcher Herkunft und zu welchem Zeitpunkt ein Gen eingeschaltet wird, kann zur Beurteilung ob ein bestimmter Phänotyp auftritt verwendet werden. Im Zuge dieses Projektes soll anstelle der Selektion nach phänotypischen Kriterien oder bloßem Vorhandensein eines Genes die Genexpression als Selektionsgrundlage benutzt werden. Als Versuchsmaterial wurden verschiedene Sorten ohne (Agata, Erika, Fabiola, Roko, Suleika) bzw mit Agria, Fontane, Innovator, Umatilla Russet, Sinora) Verarbeitungseignung (insgesamt je 17 Sorten) und unterschiedlicher Krautfäuleeristenz vom NÖS zur Verfügung gestellt. Die Genexpression wird in verschiedenen Entwicklungsstadien mit Microarray und bei Kandidatengen auch mit quantitativer reverse transcript-(qRT)-PCR untersucht.

Der im ARC entwickelte Microarray hat gegenüber bisher weltweit entwickelten (und z.T. eingestellten) Microarrays den Vorteil der Verfügbarkeit und bietet mit der kompletten in Haus Produktion auch die Möglichkeit einer ständigen Neuanpassung bei Bedarf. Ein weiterer Vorteil bietet die spezifische Anreicherung von Sonden für Stress-, Stärke- und Knollenbildungsspezifischen Genen mit relevante Elementen für die moderne Kartoffelzüchtung.

Danksagung

Dieses Projekt wird vom FFG Projekt BRIDGE 815472, der Niederösterreichische Saatbau GmbH, der AGRANA Stärke GmbH und Raiffeisen Ware Austria AG gefördert.

Tabelle 2: Mit SBE2.1 ko-exprimierte A. thaliana Gene in 228 ausgewählten Experimenten

Probennummer	Bezeichnung	Exp 1	Exp 2	228 Experimente	Pearson Korrelation
bait **	SBE2.1 (STARCH BRANCHING ENZYME 2.1)	9,147117393	9,414529473	bait
263912_at	SBE2.1 (STARCH BRANCHING ENZYME 2.1)*	9,147117393	9,414529473	1,000
246829_at	PWD (PHOSPHOGLUCAN WATER DIKINASE)*	9,556487227	9,223559393	0,892
252468_at	ATPHS2/PHS2 (ALPHA-GLUCAN PHOSPHORYLASE 2)*	10,461565450	10,321447020	0,886
262784_at	SEX1 (STARCH EXCESS 1)*	10,545539860	10,469329800	0,876
255331_at	similar to unnamed protein product	7,801089565	7,985836237	0,854
266120_at	ATIDD5 (INDETERMINATE(ID)-DOMAIN 5)	8,756171686	8,835821639	0,853
256746_at	glucan phosphorylase*	8,817071621	9,194602354	0,832
261075_at	binding	8,286032751	8,080182703	0,830
255013_at	similar to unknown protein	7,079337667	7,159626989	0,829
245094_at	DPE2 (DISPROPORTIONATING ENZYME 2)*	10,387997490	10,377982270	0,829
266856_at	ATPDR4/PDR4 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 4)	9,716184915	9,396301525	0,828
262629_at	ACD32.1 (ALPHA-CRYSTALLIN DOMAIN 31.2)	10,412384890	10,512624030	0,826
251155_at	unknown protein	9,882539919	9,631175706	0,826
245712_at	ATLDA/ATPUI (PULLULANASE 1)*	8,034138486	7,799917751	0,823
257832_at	CCL (CCR-LIKE)	9,867257979	10,153346270	0,823
...>22500 probe sets					
248518_at	similar to unknown protein	4,684512821	4,598534054	-0,795

* Bekannte in den Stärkemetabolismus involvierte Gene

** Die Pearsonkorrelation wurde jeweils mit dem bait im Vergleich zu allen anderen Genen einzeln berechnet

Literatur

- BURRELL, M.M., 2003: Starch: the need for improved quality or quantity-an overview. *J. Exp. Bot.* 54, 451-456.
- FERNIE, A.R., L. WILLMITZER und R.N. TRETHERWEY, 2002: Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. *Tr. Plant Sci.* 7, 35-41.
- GEIGENBERGER, P., 2003: Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *J. Exp. Bot.* 54, 457-465.
- KLOOSTERMAN, B., O. VORST, R.D. HALL, R.G.F. VISSER und C.W. BACHEM, 2005: Tuber on a chip: differential gene expression during potato tuber development. *Plant Biotech. J.* 3, 505-519.
- LYTOVCHENKO, A., U. SONNEWALD and A.R. FERNIE, 2007: The complex network of non-cellulosic carbohydrate metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 227-235.

Polygenic response of potato to late blight following exposure to long-day or short-day by monitoring of gene expression with a cDNA microarray

Bodo Trognitz^{1*}, Friederike Trognitz¹, J. Rodewald¹ and A. Weilharter¹

Abstract

Potato was exposed in a factorial-design experiment to short-day and to long-day for 4 weeks. Following the photoperiod treatment, the plants were inoculated with the late blight agent, *P. infestans*. Long-day had a strong resistance-enhancing effect. The transcriptome at 24 h post inoculation was analysed by hybridisation to the RLP microarray representing 4000 genes involved in resistance, light, and photoperiod perception. The complex alterations of the transcriptome are under study.

Keywords: Microarray, *Phytophthora infestans*, potato, resistance, *Solanum tuberosum*

Introduction

It is a well known phenomenon that late maturing cultivars are highly sensitive to light and photoperiod and tuberise under the inductive short days at the end of the European season, whereas early cultivars form tubers even in long-day. Both, tuberisation and flowering have been demonstrated to be controlled by the same set of genetic loci (RODRIGUEZ-FALCON et al. 2006). We constructed and used a cDNA microarray as a research tool to study the genetic inter-relationships of maturity and late blight resistance in potato.

Materials and Methods

Plants and trials tackling photoperiod and resistance response interactions

Three potato cultivars differing in their maturity and late blight resistance were involved. MF-II is the male-sterile female parent of Indian descent (M. UPADHYA, International Potato Center, Lima, Peru, 1999, pers. comm.) of a true potato seed (TPS) variety developed at the International Potato Centre. MF-II possesses a single R gene for resistance to blight (B. TROGNITZ et al., unpublished). TPS67 is the pollinator parent of the same TPS variety, it also carries a major late blight resistance gene (B. TROGNITZ et al. unpublished). Both clones are late maturing in Europe and present elevated levels of blight resistance, even when their R genes are broken down by *Phytophthora infestans* populations occurring in the area. In contrast, the Austrian cultivar Linzer Delikatess is early-maturing and highly susceptible to blight.

Pot plants (2 replications/treatment, 4 pots/rep) were pre-treated for 4 wk with either long-day (LD; 15 h) or short-

day (SD; 8 h light) and then kept under natural >14-h-light. Immediately following the photoperiod treatment part of the plants were inoculated with water to serve as a control („C“), and all other plants were inoculated with *P. infestans* („P“) to invoke the inherent genomic response to blight. Leaf samples from the upper part of the plants were shock-frozen in liquid nitrogen 24 h post inoculation, for analysis of the transcriptome. Late blight disease was evaluated at 4 and 6 dpi and reported as the average percent foliage blighted, for all cultivars and photoperiod pre-treatments. In addition, flowering intensity, increase of total stem length from start to completion of the photoperiod treatments, and tuber development were recorded.

Analyses of variance and appropriate comparisons of means were applied for data analysis.

RLP Microarray and hybridisation of cDNA samples

The thematic Resistance-Light-Photoperiod response (RLP) microarray was built using a normalised cDNA library of the short-day adapted Peruvian cultivar Yungay (field resistant, no R genes as evaluated by its susceptibility to the 0-race of *P. infestans*) challenged by late blight (3475 probes, produced by VERTIS GmbH, Freising, Germany) and cDNA clones selected from resources held at The Institute of Genomic Research (1177 probes purchased from the Arizona Genomics Institute, Arizona, USA.), 19 probes for pathogen defense-related genes of *S. caripense* (F. TROGNITZ 2004), and several housekeeping genes for control purposes.

Extraction of RNA, generation of cDNA, fluorescent dye labeling, and two-color hybridisation on the RLP array were performed following standard procedures. Information on these procedures is available upon request from the authors.

Results and Discussion

Plant experiments

Blight was significantly ($P < 0.001$) reduced on LD pre-treated, genetically resistant cultivars, whereas the susceptible Linzer Delikatess developed severe disease symptoms under all conditions (Figure 1). For the blight resistant cultivars, MF-II and TPS67, those parts of the plants that had developed during the day length treatments, were less affected

¹ Austrian Research Centers GmbH, A-2444 SEIBERSDORF

* Contact person: Dr. Bodo TROGNITZ, bodo.trognitz@ars.ac.at

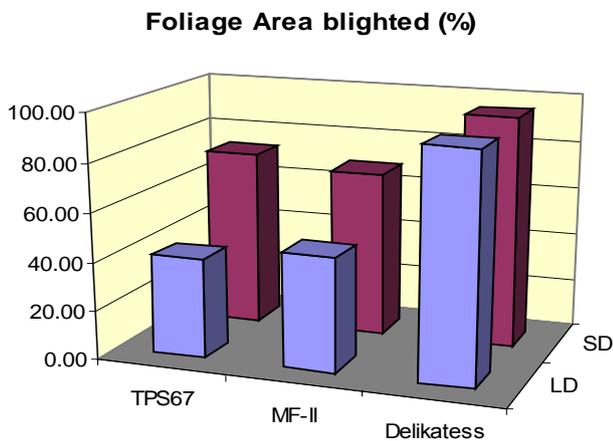


Figure 1: Effect of photoperiod on late blight resistance of potato. Cultivars TPS67 and MF-II carrying active blight resistance genes developed after 4 wk 15-h-day (LD) higher resistance levels to blight than after 8-h lighting (SD). The susceptible and early cultivar Linzer Delikatess remained equally susceptible under all conditions.

by blight than the older parts in LD-treatment; SD-treated plants did not show these differences (Figure 2).

There was a tendency to increased plant growth under LD ranging from 31 (Linzer Delikatess) to 40 cm (TPS67) increase of total stem length, relative to 30 and 37 cm increase under SD. MF-II and TPS67 flowered only after LD but not after SD, and tuberization was induced by SD in these two cv.s, whereas Linzer Delikatess did not flower

under any conditions and produced tubers independent of day length.

The positive correlation of long vegetative periods and blight resistance in the field is a well known phenomenon. Late potatoes generally display lower blight scores than earlier types and LOWE and HARRISON (1995) showed by quantitative PCR that *P. infestans* can produce much more biomass within host tissue under short-, relative to long day length. Despite many and intensive efforts by breeders to break this correlation and to breed early-maturing, blight resistant potato cultivars, this has been of limited success (UMAERUS and UMAERUS 1994).

Potato flowering promotion under long-day was already observed by CLARKE and LOMBARD (1936). The initiation of tubers by accumulating short-day cycles was reviewed by VAN DEN BERG and EWING (1991) and RODRIGUEZ-FALCON et al. (2006) reviewed the inherent genetic mechanisms of these processes. Both flowering and the formation of tubers characterise important stages of the potato's ontogenetic development and their timing seems to have a strong impact on the length of the total vegetative period. Therefore, there is an obvious interrelationship between flowering, tuberisation, senescence, and blight resistance in the field that must have its bases in the underlying genetic mechanisms. We isolated messenger RNA from foliar tissues of the experimental materials following photoperiod treatment and challenge by *P. infestans* and transcribed these into cDNA pools for microarray-mediated monitoring of corresponding gene expression patterns.



Figure 2: Effect of photoperiod on late blight resistance of potato foliage. One week after inoculation with *P. infestans*, SD-treated samples were killed by blight. LD-pretreated samples were partially resistant and the upper parts of the foliage that had developed during the period of light treatment were much less diseased than older plant parts.

Microarray experiments

Four hybridisations of two contrasting cDNA populations at a time onto the probes of the array were made for each potato cultivar in separate. We chose a design for these hybridisations that permitted comparative analysis of cDNA pools representative of four experimental treatments; namely the combinations of LD and inoculation with water (LDC), LD and *P. infestans* (LDP), and correspondingly, SDC and SDP. Data sets comprising these four treatments and contrasts of the treatments were generated for each cultivar in the LIMMA module of the R statistical analysis software. Analyses of gene expression patterns included clustering by various parameters and review of potential function as derived from the genes annotations. By drawing the contrast of the contrasts (LDP-LDC) and (SDP-SDC), a total of more than 800 probes/genes on the RLP array were revealed that appeared significantly regulated by the underlying individual treatments ($P < 0.001$, Table 1).

Table 1: Total numbers of probes/genes on the RLP microarray that appeared significantly regulated within cv. MF-II, TPS67, or Linzer Delikatess following inoculation with *P. infestans* subsequent to LD and SD (PiSD-PiLD), treatment with opposite daylength (SD-LD), and day length treatment versus *P. infestans* challenge (DL-Pi).

Contrast	MF-II Resistant	TPS67 Resistant	Linzer Delikatess Susceptible
PiSD-PiLD	817	791	394
SD-LD	1526	370	167
DL-Pi	1456	934	306

Searching among these 800 probes/genes for those that appear differentially regulated by both LD + *P. infestans* and SD + *P. infestans* within the two blight-resistant cultivars, MF-II and TPS67, but that were not or oppositely regulated in the susceptible cultivar Linzer Delikatess revealed a small group of 20 cDNAs that were highly significantly regulated and that were at the same time significantly differently regulated in SD relative to LD. Nine of these encode proteins of unknown function, whereas 9 cDNAs represent genes of putative functions in ion transport, ethylene, jasmonate, and ABA signaling, protein catabolism and transport, and resistance. Two separate probes of the array that are homologous to the *Arabidopsis thaliana* gene *NDR1* (*NONSPECIFIC DISEASE RESISTANCE 1*, CENTURY et al. 1997) were also strongly regulated in the resistant but not in the susceptible cultivar.

Subsequent experiments will be performed to confirm these results and to investigate the specific role of *NDR1* and the other relevant genes in the context of both photoperiod response and late blight resistance.

Conclusions

Our experiments confirm late blight resistance is strongly compromised by SD pre-treatment of the green plant parts. Photoperiod also affects plant growth, tuber yield, and flowering of sensitive potato genotypes.

The thematic RLP microarray (5000 single genes, 18% of potato genome) is a useful tool to discern gene expression patterns of solanaceous plants upon challenge by stress and of genes related to perception of light and photoperiod.

Already one day after first contact of potato hosts with the *P. infestans* pathogen the expression levels of up to 1000 genes, the equivalent of some 3% of the potato genome, may be altered.

Even between genotypes of comparable resistance level, profound differences in gene expression occur. However, evidence supports the hypothesis that only a few genes may be responsible for the discriminatory expression patterns of resistant vs. susceptible potato phenotypes, represented here the cultivars MF-II and TPS67 (resistant) and Linzer Delikatess (susceptible). Whether some or all of the genes involved in photoperiod-dependent blight resistance also are causally involved in the initiation of flowering, tuberisation, and thus, in shaping the individual length of a genotype's vegetative period, will require additional data analyses and studies.

Acknowledgement

This research was supported by the CIP-ARC collaborative research project Genomic analysis of the effect of photoperiod on late blight resistance in potato (2003-2007), funded by BMLFUW.

References

- LOWE, R. and J.G. HARRISON, 1995: Stability of R-gene resistance to late blight in potato leaves. *SCRI Ann Rep* 1995: 117-118.
- CLARKE, A.E. and P.M. LOMBARD, 1939: Relation of length of day to flower and seed production in potato varieties. *Amer Potato J* 16: 236-244.
- VAN DEN BERG, J.H. and E.E. EWING, 1991: Jasmonates and their role in plant growth and development, with special reference to the control of potato tuberization: a review. *Amer Potato J* 68: 781-794.
- STEWART, H.E., J.E. BRADSHAW and B. PANDE, 2003: The effect of the presence of R-genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) on the underlying level of field resistance. *Plant Pathol* 52: 193-198.
- UMAERUS, V. and M. UMAERUS, 1994: Inheritance of resistance to late blight. in: Mackay GR (ed) *Inheritance of resistance to late blight*. pp. 365-401. CAB International, Wallingford, UK.
- CENTURY, K.S., A.D. SHAPIRO, P.P. REPETTI, D. DAHLBECK, E. HOLUB and B.J. STASKAWICZ, 1997: *NDR1*, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. *Science* 278: 1963-1965.
- RODRIGUEZ-FALCON, M., J. BOU and S. PRAT, 2006: Seasonal Control of Tuberization in Potato: Conserved Elements with the Flowering Response. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:151-80.
- TROGNITZ, F., 2004: Genetic and molecular characterization of late blight resistance in *Solanum caripense*. Ph D thesis, Univ Agric Vienna, Austria, 127 pp. (<http://magnum.bibvb.ac.at/ALEPH/-/ext-find?base=ACC01&find=IDN=AC04118996>).

Molecular Breeding Research with Sugar Beet

Friedrich J. Kopisch-Obuch^{1*}, G.G.G. Capistrano, A. Müller,
 H.-J. Harloff, S.L.M. Frerichmann and C. Jung

Abstract

Breeding research in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) is supported by a number of molecular tools. This paper gives a short overview of the most important tools and presents some of the molecular breeding research currently conducted at the University of Kiel including the establishment of a sugar beet TILLING platform, the cloning of beet cyst nematode resistance from *B. procumbens* and breeding of sugar beet as a winter crop.

Keywords:

sugar beet, *Beta vulgaris*, molecular breeding

Several genetic linkage maps of the 758 Mb sugar beet genome have been developed in the past years including a more recent map covering 664 cM and comprising 315 expressed sequence tag (EST) markers (SCHNEIDER et al. 2007). These maps have been extensively used for mapping of traits with agronomic importance (WEBER et al. 2000, SCHAFFER-PREGL et al. 1999, GRIMMER et al. 2008, LEIN et al. 2007, JANSSEN et al. 2003, NILSSON et al. 1999, GIDNER et al. 2005, WEBER et al. 1999, SETIAWAN et al. 2000, SCHNEIDER et al. 2002, TAGUCHI et al. 2008, LEIN et al. 2008). Further resources are large insert libraries (HOHMANN et al. 2003, LANGE et al. 2008, SCHULTE et al. 2006) and about 26,000 publicly available ESTs of which more than 13,000 represent distinct genes (DFCI Beet Gene Index, 2008). Physical mapping and sequencing of the whole sugar beet genome is in progress (LANGE et al. 2008) and supported by high resolution FISH (fluorescent *in situ* hybridisation) resolving down to 1 kb (D. Dechyeva, personal communication). The complete *B. vulgaris* DNA sequence is expected to be available by 2011 and will provide a valuable tool for sugar beet genomics research. Genetic transformation of sugar beet has been established for many years (GUREL et al. 2008) although complete regeneration of transformants still remains challenging.

As an alternative to genetic transformation, EMS mutagenesis has been recently established at the University of Kiel (HOHMANN et al. 2005) in order to study gene function and to obtain *de novo* genetic variation in sugar beet germplasm. A TILLING platform (COMAI and HENIKOFF 2006) for sugar beet has been established allowing high throughput identification of mutations in candidate genes and their subsequent phenotypic characterization. A sugar beet mutant

population is currently being screened for mutants with functional alteration in putative flowering genes and first mutants have been identified. This mutant population was generated from an annual sugar beet inbred line and comprises about 1,100 M2 families. A second mutant population generated from a biennial DH line is currently in work.

Cloning of resistance to beet cyst nematode (BCN, *Heterodera schachtii* Schmidt) has been an objective at the University of Kiel for more than 15 years leading to the cloning of the resistance gene *HsI^{pro-1}* (CAI et al. 1997). BCN is the most severe pest in sugar beet and the only sources of resistance are the wild species *B. procumbens* and the related species *B. webbiana* and *B. patellaris*. Two resistant sugar beet lines A906001 and TR363 carrying translocations from *B. procumbens* at the end of chromosome 9 are used for cloning a 2nd resistance gene *HsI⁻¹* which is tightly linked to the previously cloned resistance gene *HsI^{pro-1}*. The size of the translocation from the line A906001 was estimated to be 1500 kb. A physical map of this translocation was established encompassing 18 BAC clones with a total length of their inserts of 1,415 kb. The BAC contigs are separated by 4 small gaps. Since this translocation is too big to find an individual gene we have created a 400 Gy gamma mutated population. 2670 seeds were irradiated and, after screening of 578 M1 offspring with three molecular markers evenly spread around the translocation, two mutants were found which had lost most of the translocation including the *HsI⁻¹* gene. By comparative mutant analysis the region housing the *HsI⁻¹* gene could be narrowed down to ca. 300 kb. The *HsI⁻¹* gene is presently being identified from the sequences of 3 BACs covering the critical region of the translocation. Complementation studies on sugar beet hairy roots will be conducted to determine the putative function of the candidate genes present in this region.

A promising strategy to increase the yield potential of sugar beet is to grow it as winter crop thus extending its vegetation period. However, this has not been achieved as sugar beet starts bolting after prolonged exposure to cold during winter (vernalization). The tendency for early bolting (without a requirement for vernalization) is under the control of a single dominant gene termed *B* which is currently being cloned from its position on chromosome 2 (HOHMANN et al. 2003, GAAFAR et al. 2005, MÜLLER and JUNG, unpublished data). As a result of strong selection against early bolting, commercial sugar beet cultivars do not contain a functional *B* allele and behave as biennials. In the absence of *B*, induction and timing of flowering depends on vernalization

¹ Institute of Plant Breeding, University of Kiel, Am Botanischen Garten 1-9, D-24118 KIEL

* Ansprechpartner: Dr. Friedrich J. KOPISCH-OBUCH, f.kopisch@plantbreeding.uni-kiel.de

and requires appropriate photoperiodic and developmental conditions. The recent identification and functional analysis of sugar beet genes with homology to *FLC* and *CO*, two key floral transition genes in *Arabidopsis*, provide first evidence for conservation of the genetic basis of flowering time control in sugar beet (CHIA et al. 2008, REEVES et al. 2007). These genes and others that have been identified at the University of Kiel are prime candidates for targeted genetic approaches to suppress, or induce, flowering under controlled conditions.

In addition to controlled bolting behaviour, winter sugar beets also require sufficient winter hardiness to be grown as a winter crop and little research has been aimed at this until now. Winter hardiness in sugar beet is expected to be a complex trait comprising tolerance to frost and other abiotic stresses as well as resistance to biotic stresses exposed to with or without snow covering. Further, frost tolerance as the most obvious factor can be achieved by physiological plant characteristics such as osmotic potential and by morphological characteristics such as escape mechanisms conditioned by plant architecture. Currently, about 400 biennial *B. vulgaris* accessions sown in August are grown in a replicated overwintering field trial at two locations in Belarus and two locations in Germany. The accessions comprise the cultivated forms sugar beet, leaf beet (Swiss chard), red table beet and fodder beet as well as the wild beet *B. vulgaris maritima*. The objectives of this experiment is (i) to investigate the genetic variation of winter hardiness in the *B. vulgaris* gene pool, (ii) to record plant architecture traits potentially affecting winter hardiness and (iii) to identify sources of winter hardiness that can be exploited for the development of winter sugar beets.

References

- CAI, D., M. KLEINE, S. KIFLE, H. HARLOFF, N.N. SANDAL, K.A. MARCKER, R.M. KLEIN-LANKHORST, E.M.J. SALENTIEN, W. LANGE, W.J. STIEKEMA, U. WYSS, F.M.W. GRUNDLER and C. JUNG, 1997: Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275:832-834.
- CHIA, T.Y.P., A. MULLER, C. JUNG and E.S. MUTASA-GOTTGENS, 2008: Sugar beet contains a large CONSTANS-LIKE gene family including a CO homologue that is independent of the early-bolting (B) gene locus. *J. Exp. Bot.* 59:2735-2748.
- COMAI, L. and S. HENIKOFF, 2006: TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery. *Plant J.* 45:684-694.
- DFCI Beet Gene Index, 2008: Available at: <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=beet>
- EL-MEZAWY, A., F. DREYER, G. JACOBS and C. JUNG, 2002: High resolution mapping of the bolting gene *B* of sugar beet. *Theoretical and Applied Genetics* 105:100-105.
- GAAFAR, R.M., U. HOHMANN and C. JUNG, 2005: Bacterial artificial chromosome-derived molecular markers for early bolting in sugar beet. *Theoretical and Applied Genetics* 110:1027-1037.
- GIDNER, S., B.L. LENNEFORS, N.O. NILSSON, J. BENSEFELT, E. JOHANSSON, U. GYLLENSPETZ and T. KRAFT, 2005: QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome* 48:279-285.
- GRIMMER, M.K., T. KRAFT, S.A. FRANCIS and M.J.C. ASHER, 2008: QTL mapping of BNYVV resistance from the WB258 source in sugar beet. *Plant Breeding* 127:650-652.
- GUREL, E., S. GUREL and P.G. LEMAUX, 2008: Biotechnology applications for sugar beet. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27:108-140.
- HOHMANN, U., G. JACOBS and C. JUNG, 2005: An EMS mutagenesis protocol for sugar beet and isolation of non-bolting mutants. *Plant Breeding* 124:317-321.
- HOHMANN, U., G. JACOBS, A. TELGMANN, R. GAAFAR, S. ALAM, and C. JUNG, 2003: A bacterial artificial chromosome (BAC) library of sugar beet and a physical map comprising the bolting gene *B*. *Molecular and General Genomics* 269:126-136.
- JANSSEN, G.J.W., M. NIHLGARD and T. KRAFT, 2003: Mapping of resistance genes to powdery mildew (*Erysiphe betae*) in sugar beet. *International Sugar Journal* 105:448-451.
- LANGE, C., D. HOLTGRÄWE, B. SCHULZ, B. WEISSHAAR and H. HIMMELBAUER, 2008: Construction and characterization of a sugar beet (*Beta vulgaris*) fosmid library. *Genome* 51:948-951.
- LEIN, J.C., K. ASBACH, Y.Y. TIAN, D. SCHULTE, C.Y. LI, G. KOCH, C. JUNG and D.G. CAI, 2007: Resistance gene analogues are clustered on chromosome 3 of sugar beet and cosegregate with QTL for rhizomania resistance. *Genome* 50:61-71.
- LEIN, J.C., C.M. SAGSTETTER, D. SCHULTE, T. THURAU, M. VARRELMANN, B. SAAL, G. KOCH, D.C. BORCHARDT and C. JUNG, 2008: Mapping of rhizoctonia root rot resistance genes in sugar beet using pathogen response-related sequences as molecular markers. *Plant Breeding* 127:602-611.
- NILSSON, N.O., M. HANSEN, A.H. PANAGOPOULOS, S. TUVESSE, M. EHLDE, M. CHRISTIANSSON, I.M. RADING, M. RISSLER and T. KRAFT, 1999: QTL analysis of *Cercospora* leaf spot resistance in sugar beet. *Plant Breeding* 118:327-334.
- REEVES, P.A., Y.H. HE, R.J. SCHMITZ, R.M. AMASINO, L.W. PANELLA, and C.M. RICHARDS, 2007: Evolutionary conservation of the FLOWERING LOCUS C-mediated vernalization response: Evidence from the sugar beet (*Beta vulgaris*). *Genetics* 176:295-307.
- SCHAFFER-PREGL, R., D.C. BORCHARDT, E. BARZEN, C. GLASS, W. MECHELKE, J.F. SEITZER and F. SALAMINI, 1999: Localization of QTLs for tolerance to *Cercospora beticola* on sugar beet linkage groups. *Theoretical and Applied Genetics* 99:829-836.
- SCHNEIDER, K., D. KULOSA, T.R. SOERENSEN, S. MOHRING, M. HEINE, G. DURSTEWITZ, A. POLLEY, E. WEBER, JAM-SARI, J. LEIN, U. HOHMANN, E. TAHIRO, B. WEISSHAAR, B. SCHULZ, G. KOCH, C. JUNG and M. GANAL, 2007: Analysis of DNA polymorphisms in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and development of an SNP-based map of expressed genes. *Theor. Appl. Genet* 115:601-615.
- SCHNEIDER, K., R. SCHAFFER-PREGL, D.C. BORCHARDT and F. SALAMINI, 2002: Mapping QTLs for sucrose content, yield and quality in a sugar beet population fingerprinted by EST-related markers. *Theoretical and Applied Genetics* 104:1107-1113.
- SCHULTE, D., D.G. CAI, M. KLEINE, L.J. FAN, S. WANG and C. JUNG, 2006: A complete physical map of a wild beet (*Beta procumbens*) translocation in sugar beet. *Molecular Genetics and Genomics* 275:504-511.
- SETIAWAN, A., G. KOCH, S.R. BARNES and C. JUNG, 2000: Mapping quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Cercospora* leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.) in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100:1176-1182.
- TAGUCHI, K., N. OGATA, T. KUBO, S. KAWASAKI and T. MIKAMI, 2009: Quantitative trait locus responsible for resistance to *Aphanomyces* root rot (black root) caused by *Aphanomyces cochlioides* Drechs. in sugar beet. *Theor. Appl. Genet.* 118, 227-234.
- WEBER, W.E., D.C. BORCHARDT and G. KOCH, 1999: Combined linkage maps and QTLs in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) from different populations. *Plant Breeding* 118:193-204.
- WEBER, W.E., D.C. BORCHARDT and G. KOCH, 2000: Marker analysis for quantitative traits in sugar beet. *Plant Breeding* 119:97-106.

Studies of the tolerance of maize hybrids to corn rootworm in Hungary

Csaba L. Marton^{1*}, Csaba Szöke¹ and János Pinter¹

Abstract

The appearance of corn rootworm is one of the greatest plant protection challenges that European maize production has faced in its 500-year history. Since the first specimens were caught in 1992, the pest has now spread to all the major maize-growing areas in the Carpathian Basin. Control of the pest is complicated by the fact that farmers often ignore the need for crop rotation, the most effective measure, despite ministry regulations. Chemical control not only increases production costs, but is not always effective. The present paper describes studies on the tolerance level of 43 Martonvásár hybrids at three locations in two years. Significant differences were found in the tolerance levels of the hybrids, and a close positive correlation was revealed between root-pull resistance and yield, while there was a close negative correlation between root lodging and yield and between root-pull resistance and lodging. Root regeneration is also an important factor, good values of which were found for three hybrids.

Key words: Western corn rootworm, tolerance level, resistance breeding

Introduction

Maize production is one of the most important sectors of agriculture in Hungary. On the basis of profitability it has been one of the top-ranking field crops in recent years, and is grown on an area of around 1.1-1.2 hectares. Until recently, apart from a few pathogens, it has suffered little damage from pests, but this situation changed after the appearance of the corn rootworm in 1995, which became a major maize pest within a few years (RIPKA 2007). It is estimated that around 100,000 ha were affected on a third of which lodging has been recorded. No accurate data are available on the yield losses suffered in Hungary, but they probably amount to around 5% on a national scale. The yield losses caused by the pest may range from only a few per cent to as much as 70-80% (SIVCEV and TOMASEV 2002, NAGY et al. 2003). American data indicate that yield losses combined with the cost of control lead to a loss of income amounting to around a billion dollars a year (KRY-SAN and MILLER 1986). Insect numbers and the extent of damage are greatly influenced by the weather in the given year (KESZTHELYI 2006).

In addition to agronomic, chemical and biotechnological control measures, work has been underway for several de-

acades to breed maize varieties resistant to the pest (BIGGER et al. 1941, OWENS et al. 1974, ABEL et al. 2000, PEPÓ and BÓDI 2006, IVEZIC et al. 2006). Among the three basic mechanisms of host-plant resistance (non-preference, antibiosis, tolerance) defined by PAINTER (1951), conventional plant breeding can only be based on tolerance, where differences arise mainly as the result of diverse growth habits (stronger stalks, more robust root mass, better root regeneration). According to SEITZ (2006) a combination of molecular markers and the DH technology could open up new possibilities in breeding against the pest. The present paper aimed to determine the corn rootworm tolerance levels of sixty maize hybrids.

Materials and methods

In order to determine the level of tolerance against corn rootworm, 43 Martonvásár maize hybrids were sown in experiments at three locations with three replications in 2007 and 2008. All parental inbred lines of the 43 hybrids were also evaluated in 2008. The extent of natural rootworm infection in the previous year and the type of soil were taken into consideration when choosing the locations, which included heavily infested chernozem soils only. The two-rowed plots were 6 m in length with row and plant spacings of 0.7 m and 0.2 m, respectively. At each location the root-pull resistance was recorded on two occasions (end of June, middle of Sept.) on 5 plants per plot for each genotype, after which the visible root damage was scored using the Iowa scale (1: no damage, 6: loss of three or more root levels) and the root diameter was measured. The latter values were used to determine the extent of root regeneration (by subtracting the June values from the September values). After counting the number of lodged plants the yield was harvested from a 2 m section of each plot. The data were evaluated using analysis of variance and regression analysis.

Results and discussion

Different levels of root damage were recorded for the tested hybrids at the three locations and in the two years. The infestation was most severe in Kőszárhegy in 2007, followed by Lászlópuszta, with the least damage in Martonvásár. A higher level of infestation was expected based on the corn rootworm damage in the previous year. The infestation was most severe in Martonvásár in 2008, followed by Lászlópuszta, with the least damage in Martonvásár. Differences in the degree of infestation were also observed between the two scoring dates for root damage in 2007. At the second scoring date there was a substantial reduction in damage compared

¹ Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Brunszvik Street 2, H-2462 MARTONVÁSÁR

* Contact person: D.Sc. Csaba L. MARTON, martonsc@mail.mgki.hu

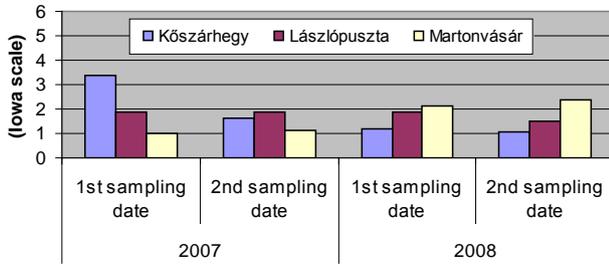


Figure 1: Root injury in different locations, averages of hybrids (2007-2008)

with the first scoring date in Kőszárhegy, mainly due to root regeneration (Figure 1), which could be attributed partly to timely rainfall and partly to genetic differences in regeneration between the hybrids. There was no significant differences between the two sampling date in 2008.

The 43 genotypes tested had different levels of tolerance of the pest, as shown by the considerable differences in root-pull resistance (72-126 kp) and in the values on the Iowa scale (1.2-2.4) (Figure 2). Hybrids with greater root-pull resistance values exhibited significantly less root damage than those with weaker resistance.

In 2008, the resistance levels of both the hybrids and their parent lines were investigated in all three locations. The degrees of root infection demonstrates that corn rootworm damaged the inbred lines 20% more severely than hybrids according to Iowa scale (Figure 3).

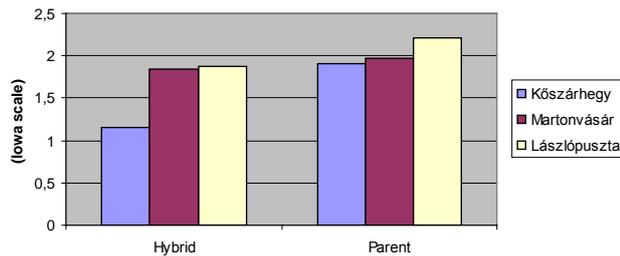


Figure 3: Root injury of the hybrids and lines in different locations (First sample, 2008)

Inbred lines have smaller root diameter (Figure 4) and lower root pull resistance than hybrids (Figure 5). The heterosis on root diameter, compared to the average of parents is 140%, while in case of root pull resistance the heterosis is 123%. However, significant variation can be observed in the root pull resistance of inbred lines. The root pull resistance was 37 kp for the inbred lines with the weakest resistance, and 129 kp for the strongest ones, requiring 3 times larger force to be pulled out from the soil. The low level of heterosis

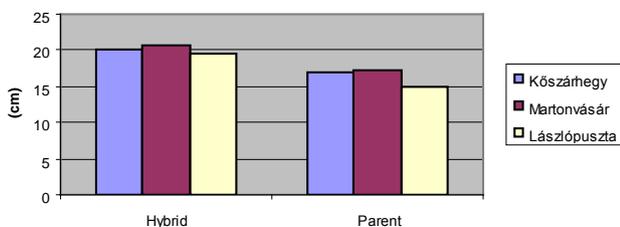


Figure 4: Root size of the hybrids and lines in different locations (First sample, 2008)

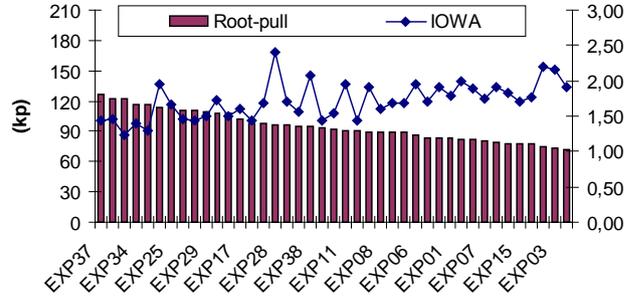


Figure 2: Root-pull and root injury of the hybrids (average of 3 locations, 2 years and 2 samples)

and the wide range of variation enable efficient selection during inbreeding.

Conclusions

The 43 maize hybrids tested were found to have different levels of tolerance against the corn rootworm. Tolerance is based mainly on external traits such as a stronger root system

with better regeneration ability. Some hybrids had outstanding root regeneration ability. The selection method used in the experiments, based on root-pull resistance measurements combined with the counting of lodged plants and the scoring of root damage on the Iowa scale, proved to be suitable for the relatively rapid testing of the tolerance of large numbers of maize genotypes.

Inbred lines had smaller root diameter and lower root pull resistance than hybrids. The heterosis on root diameter, was 140%, while in case of root pull resistance the heterosis is 123%. However, significant variation can be observed in the root pull resistance of inbred lines. The root pull resistance was 37 kp for the inbred lines with the weakest resistance, and 129 kp for the strongest ones. The low level of heterosis and the wide range of variation enable efficient selection during inbreeding.

Acknowledgements

The research was supported by Jedlik Ányos application (OM 00063/08).

References

ABEL, C.A., M.A. BERHOW, R.L. WILSON, B.F. BINDER and B.E. HIBBARD, 2000: Evaluation of Conventional Resistance to European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) and Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) in Experimental Maize Lines Developed from a Backcross Breeding Program. Journal of Economic Entomology 93, 1814-1821.

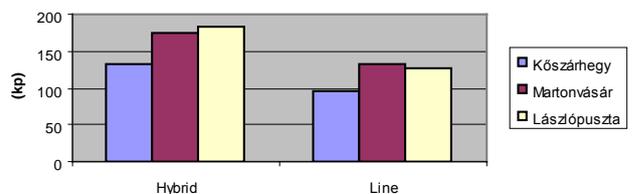


Figure 5: Root pull values of the hybrids and lines in different locations (First sample, 2008)

- BIGGER, J.H., R.O. SNELLING and R.A. BLANCHARD, 1941: Resistance of corn strains to the southern corn rootworm, *Diabrotica duodecimpunctata* (F.). J. Econ. Entomology 34: 605-613.
- HATALÁNÉ ZSELLÉR I. and E. SZÉLL, 2001: Two years observations on correlation of larvae damage of western corn rootworm and yields. XXI. IWGO Conference XIII. Diabrotica Subgroup Meeting, Legnaro-Padua-Venice, Italy Abstracts, 5.
- IVEZIC M., J.J. TOLLEFSON, E. RASPUDIC, I. BRKIC, M. BRMEZ and B.E. HIBBARD, 2006: Evaluation of corn hybrids for tolerance to corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) larval feeding. Cer. Res. Commun., 34: 1001-1007.
- KESZTHELYI, S., 2006: Az amerikai kukoricabogár (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) 2005. évi rajzása egy talajfertőtlenített kukoricatáblában az időjárás függvényében. (Flight of Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) on a disinfected maize field as a function of the weather) Növénytermelés 55: 173-182.
- KRYSAN, J.L. and T.A. MILLER, 1986: Methods for study of pest *Diabrotica*. Springer-Verlag, New York, USA.
- NAGY, G., J. KOMÁROMI and J. KISS, 2003: Az amerikai kukoricabogár lárvakártételének hatása a monokultúrában termesztett kukorica terméseredményeire. (Effect of larval damage by the Western Corn Rootworm on the yield of continuous maize.) Gyakorlati Agrófórum, (Extra 4): 9-10.
- OWENS, J.C., D.C. PETERS, A.R. HALLAUER, 1974: Corn rootworm tolerance in maize. Environ. Entomology 3: 767-772.
- PAINTER, R.H., 1951: Insect Resistance in Crop Plants. University of Kansas Press, Lawrence, KS.
- PEPÓ, P. and Z. BÓDI, 2006: Adaptation of maize lines and hybrids to abiotic/biotic stresses Acta Agronomica Hungarica, 54: 397-403.
- RIPKA, G., 2007: A kukoricabogár magyarországi elterjedése és kártétele. Mag kutatás, fejlesztés és környezet. XXI: 4-6.
- SIVCEV, I. and I. TOMASEV, 2002: Distribution of *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte in Serbia in 1998. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 37, 145-153.
- SZÉLL, E., I. ZSELLÉR, G. RIPKA, J. KISS and G. PRINCZINGER, 2005: Strategies for controlling Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) Acta Agronomica Hungarica 53, 71-79.

Pyramiding von Resistenzgenen gegen das Zucchini Gelbmosaikvirus in Ölkürbis (*Cucurbita pepo*)

Martin Pachner^{1*} und Tamas Lelley¹

Abstract

A catastrophic virus epidemic in 1997 led to considerable crop failure in Styrian oil pumpkin (*Cucurbita pepo*) which possessed no resistance to the Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV). The aim of the here described work was, to combine several resistances against the virus in the Austrian oil pumpkin breeding material. At the beginning we used American zucchini varieties containing resistance genes from the *C. moschata* landrace Nigerian Local. Later an Israeli zucchini breeding line, the resistance of which originated from the *C. moschata* landrace Menina, Portugal, was also used. In the meantime, through crossing experiments, we identified five different resistance genes against ZYMV in the species *C. moschata*. Later, we transferred all these *C. moschata* resistances into oil pumpkin. After having generated oil pumpkin lines for each resistance and developed molecular markers (RAPD, SCAR and SSR) for three of the resistance genes, in a „Pyramiding“ programme, we brought together four resistance genes in one oil pumpkin genotype.

Key words: ZYMV, RAPD, SCAR, SSR, *Cucurbita moschata*

Zusammenfassung

Eine katastrophale Virusepidemie im Jahr 1997 hat im steirischen Ölkürbis (*Cucurbita pepo*), der keine Resistenz gegen das Zucchini Gelbmosaikvirus (ZYMV) besaß, zu erheblichen Ernteaufschlägen geführt. Ziel des hier beschriebenen Vorhabens war, mehrere Resistenzen gegen das Virus im österreichischen Ölkürbiszuchtmaterial zusammenzuführen. Am Beginn unserer Arbeiten verwendeten wir amerikanische Zuchinisorten, die Resistenzgene aus der nigerianischen Landsorte Nigerian Local (*Cucurbita moschata*) besaßen. Später kam eine israelische Zucchini Linie hinzu, deren Resistenz auf die *C. moschata* Landrasse Menina, aus Portugal, zurückgeht. In der Zwischenzeit identifizierten wir, in umfangreichen Untersuchungen, in der Art *C. moschata* fünf verschiedene Resistenzgene gegen ZYMV.

Anschließend übertrugen wir alle diese Resistenzen, durch Brückenkreuzungen mit Zucchini, in Ölkürbis. Nachdem wir für jede Resistenz Ölkürbis-Linien erzeugten und für drei der Resistenzgene molekulare Marker (RAPD, SCAR und SSR) entwickeln konnten, gelang es uns in einem „Pyramiding“-Programm vier Resistenzgene in einen Ölkürbis-Genotyp zusammenzuführen.

Einleitung

Im Jahr 1997 verursachte das Zucchini Gelbmosaikvirus (ZYMV) in Österreich Ernteaufschlägen bis zu 50%. Die Epidemie zeigte, dass die österreichischen Ölkürbissorten keine genetisch bedingte Resistenz gegen das Virus besaßen. Jedoch war genetisch bedingte Virusresistenz in der Art *Cucurbita pepo* auch nicht bekannt, daher wurden solche Gene bereits in den 1980er Jahren durch Artkreuzungen aus *C. moschata* in Zucchini übertragen (WHITAKER and ROBINSON 1986, PROVVIDENTI 1997).

Pyramiding von Resistenzgenen ist eine aussichtsreiche Strategie, die Selektion neuer Virusstämme zu verzögern und beständigere Resistenzen zu erzeugen. Diese Methode wurde bei Getreidearten aber auch bei dicotylen Arten wie z.B. Bohnen und Paprika erfolgreich angewendet (WERNER et al. 2005).

Bereits am Anfang unserer Arbeit haben wir beobachtet, dass ZYMV-Isolate aus verschiedenen geografischen Regionen, wie Singapur, Italien und Österreich unterschiedliche

Symptome und Aggressivität an Ölkürbispflanzen zeigten. Diese offensichtliche, genetische Variabilität des Virus birgt die Gefahr, dass eine monogenische Resistenz, von dem Pathogen rasch überwunden werden könnte. Demnach war das Vorhaben, den Ölkürbis mit multipler Resistenz gegen ZYMV auszustatten, nahe liegend. Wir konnten jedoch zunächst feststellen, dass alle von uns getesteten *C. moschata* Resistenzquellen ausreichende Resistenz gegen alle von uns getesteten Isolate hatten. Im Weiteren, haben wir umfangreiche Kreuzungsexperimente mit anschließenden Spaltungsanalysen in künstlichen Infektionstests durchgeführt, um die genetische Struktur der Resistenz in *C. moschata* zu ermitteln. Dabei haben wir in den von uns untersuchten fünf *C. moschata* Genotypen zumindest fünf ZYMV-Resistenzgene eindeutig identifizieren können (PACHNER and LELLEY 2004).

Diese Untersuchungsergebnisse eröffneten uns die Möglichkeit den steirischen Ölkürbis mit einer Mehrfachresistenz gegen potentiell gefährliche ZYMV-Stämme auszustatten.

¹ Universität für Bodenkultur Wien, Department Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Institut für Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

* Ansprechpartner: Ing. Martin PACHNER, martin.pachner@boku.ac.at

Material und Methoden

Als Ölkürbis Ausgangsmaterial verwendeten wir die beiden traditionellen österreichischen Sorten Gleisdorfer Ölkürbis und Retzer Gold. Die toleranten amerikanischen Zucchiniarten Tigress, Jaguar und Puma haben wir von der Fa. Harris Moran Seed Company, Davis California, Dividend und Revenue von Novartis Seeds, Inc. Naples, Florida bezogen. Die auf ZYMV-Resistenz selektierte *C. moschata* Landrassen Menina 15 aus Portugal und Nigerian Local aus Afrika wurden uns von M. Pitrat, INRA, Frankreich, und Soler aus Puerto Rico von Linda Wessel-Beaver, Univ. Puerto Rico, zur Verfügung gestellt. Die ZYMV-anfällige *C. moschata*-Sorte Waltham Butternut und die für die Artkreuzungen *C. pepo* x *C. moschata* verwendete Brücke, die israelische Zucchini Linie True French res., erhielten wir von H.S. PARIS, Neue Ya'ar Research Center, Israel. Diese Sorte enthält zwei bis drei Resistenzgene, ein dominantes Hauptgen, *Zym-1*, und zwei Modifikatorgene, *Zym-2* und *Zym-3*, gegen ZYMV aus der portugiesischen Landrasse Menina die in die Zucchini-Sorte True French übertragen wurden (PARIS and COHEN 2000),

Die Pflanzen für die künstlichen Infektionen wurden im Glashaus unter kontrollierten Bedingungen (23-25°C Tag, 20-22°C Nacht, 50-70% RF, Zusatzbelichtung mit Metallampflampen für 14 Std. Tag) gehalten. Für die Infektionen verwendeten wir ein ZYMV Mischisolat, das aus mehreren Einzelisolaten, die an verschiedenen österreichischen Standorten gesammelt wurden, zusammengefügt war (RIEDLE-BAUER 1998). Das Homogenat wurde, kurz vor der Infektion, aus gefrorenen (-20°C) infizierten Blättern, mit einer 1%igen K_2HPO_4 Lösung als Inokulationspuffer, und Celite® 545, um die Blattoberfläche zu verwunden, in einem Mörser auf Eis hergestellt. Die Infektionen erfolgten durch Aufreiben des Homogenats zunächst auf die beiden Keimblätter und 3 Tage später auf das erste Laubblatt.

Die Symptome wurden 10 bzw. 24 Tage nach Infektion ausgewertet. Zur Klassifizierung der Pflanzen als resistent oder anfällig verwendeten wir ein Skala von 0-9, wobei 0 als nicht infiziert, 1-4 als tolerant und 6-9 als anfällig bewertet wurde. Die Bonitur 5 stellt eine nicht eindeutig zuordenbare Übergangssituation dar. Es soll festgehalten werden, nachdem die Grenze zwischen Resistenz und Toleranz nicht klar definierbar ist, sprechen wir von leichter bis hin zu tolerabler Symptomausprägung von einer Resistenz.

Für die Markeranalysen wurden, zu Beginn der Untersuchungen, in einer Bulk Segregant Analyse, 1000 RAPD-Primer (Random Amplified Polymorphic DNA)

getestet. Wir fanden zunächst 24 Marker, deren Auftreten mit dem Resistenzgen *Zym-1* (Men1-Resistenz) und 5 Marker, mit *Zym-2* (Men2-Resistenz) (PARIS and COHEN 2000) korrelierten (98% bzw. 95%). Je ein RAPD Marker wurde mittels Reamplifizierung und Sequenzierung der Bande in einen SCAR-Marker (Sequence Characterized Amplified Region) umgewandelt. In einer Sammlung von 500 *Cucurbita*-spezifischer SSR-Markern, die im Rahmen eines FWF-Projektes an unserem Institut entwickelt wurden (GONG et al. 2008), fanden wir einen mit dem Resistenzgen *Zym-0* (NL2-Resistenz) (PARIS and BROWN 2005) sehr eng gekoppelten (>99%) Marker.

Die Einführung der *C. moschata* ZYMV-Resistenzgene in Ölkürbis durch Artkreuzung hat zu vier verschiedenen Resistenzen mit insgesamt fünf wirksamen Resistenzgenen geführt. Sie sind in *Tabelle 1* beschrieben.

Ergebnisse und Diskussion

Das erste Resistenz-Gen gegen das ZYMV haben wir aus amerikanischen Zucchiniarten in den steirischen Ölkürbis eingekreuzt. Dieses Gen stammte aus der nigerianischen *C. moschata* Landsorte Nigerian Local. Es zeigte gute Resistenz gegen einige ZYMV-Virusstämme (PROVVIDENTI 1997). Die zweite Resistenz haben wir aus einer israelischen Zucchini Linie in den Ölkürbis eingekreuzt, sie stammte ursprünglich aus der *C. moschata* Landrasse Menina aus Portugal (PARIS and COHEN 2000). Die Ausprägung von Reaktionssymptomen war jedoch nach künstlicher Infektion mit unserem ZYMV-Isolat bei diesen beiden Genotypen klar unterscheidbar. Diese Beobachtung veranlasste uns dazu, umfangreiche Kreuzungsexperimente und Spaltungsanalysen in künstlichen Infektionsversuchen durchzuführen, um die genetische Struktur dieser Resistenzen in *C. moschata* zu untersuchen, aber auch um eventuell weitere Resistenzgene in *C. moschata* zu finden. Letztendlich fanden wir in *C. moschata* fünf Resistenzgene (PACHNER and LELLEY 2004). Wir haben danach alle von uns identifizierten Resistenzen aus *C. moschata* in Ölkürbis eingekreuzt. Da sich Ölkürbis nicht direkt mit *C. moschata* kreuzen lässt, mussten wir Brückenkreuzung mit Zucchini durchführen.

Für unseren ersten Pyramidingversuch standen uns zunächst das dominante Resistenzgen *Zym-1* aus Menina und das von uns identifizierte rezessive *zym-4* aus Nigerian Local zur Verfügung, aber nur für *Zym-1* hatten wir einen molekularen Marker. Somit war eine eindeutige Selektion von homozygoten doppelresistenten Pflanzen in der F2 nicht möglich. Daher haben wir für die Erzeugung der F2-Nachkommen-

Tabelle 1: Resistenzgene gegen ZYMV. Die Gensymbole beziehen sich auf die Genliste von PARIS and BROWN (2005). Das Resistenzgen *Zym-3* konnten wir in unserem Zuchtprogramm nicht identifizieren; für die NL1-Resistenz wurde noch kein Gensymbol vergeben, im Text wird dafür *zym-4* verwendet. Für die fett gedruckten Resistenzgene konnten gekoppelte Marker identifiziert werden.

Resistenz	Gensymbol	Quelle	Erbverhalten	
			beschrieben in Literatur	in Ölkürbis
Men1	<i>Zym-1</i>	Menina	dominant	dominant
Men2	<i>Zym-2</i>	Menina	ergänzender dominanter Modifikator zu <i>Zym-1</i>	
Men3	<i>Zym-3</i>	Menina	ergänzender dominanter Modifikator zu <i>Zym-1</i>	
NL1	(<i>zym-4</i>)	Nigerian Local	unvollständig dominant	rezessiv
NL2	<i>Zym-0</i>	Nigerian Local	dominant	dominant
Sol	<i>zym^{mos}</i>	Soler	rezessiv	unvollständig dominant

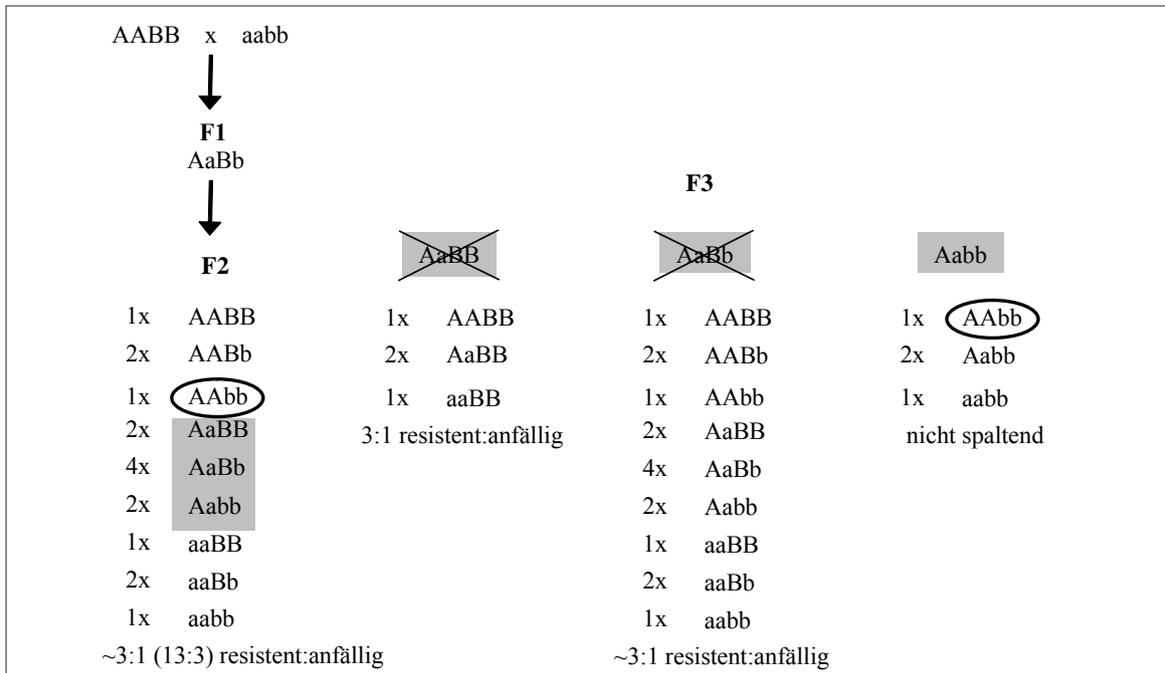


Abbildung 1: Zur Darstellung steht AA für die dominante Men1-Resistenz (*Zym-1*, markerselektiert) und bb für die rezessive NL1-Resistenz (*zym-4*, kein Marker). In der F2 können die doppelt homozygoten Pflanzen (eingekreist) nicht eindeutig identifiziert werden, weil die tolerant Pflanzen in Bezug auf ihre genetische Struktur nicht ausreichend unterscheidbar sind. Nur eine von drei möglichen F3-Populationen, deren Mutterpflanzen (F2) mit Marker auf Aa selektiert wurden (grau unterlegt) wird keine phänotypische Spaltung für die Resistenz zeigen (ganz rechts), weil darin alle Pflanzen für die NL1-Resistenz homozygot (bb) sind. Der Men1-Marker ermöglicht anschließend, aus dieser Population die homozygot doppelresistenten Genotypen auszulesen.

schaften (F3-Populationen) jene F2-Pflanzen ausgewählt, die mit dem Marker für *Zym-1* als heterozygot identifiziert werden konnten. Nur in einer von drei möglichen F2-Nachkommenschaften war keine phänotypische Spaltung für die Resistenz zu erwarten, weil darin alle Pflanzen für die NL1-Resistenz (*zym-4*) homozygot sind (Abbildung 1). Der Men1-Marker ermöglichte anschließend, aus dieser F3-Population die homozygot doppelresistenten Genotypen zu selektieren.

Da die beiden Resistenzen, *Zym-1* und *zym-4*, aufgrund spezifischer Reaktionssymptome nach künstlicher Infektion unterscheidbar sind, war es möglich die Anwesenheit des Resistenzgens *zym-4* aufgrund der für diese Resistenz spezifischen Symptome festzustellen. Das Vorhandensein des Resistenzgens *Zym-1* konnte anhand des molekularen Markers sichergestellt werden. Somit konnten wir, bereits in einem Infektionstest an der F2, Pflanzen identifizieren, die das Resistenzgen *zym-4* trugen und den Marker für *Zym-1* hatten. Dadurch konnten wir die Anzahl der potentiellen F3-Populationen deutlich einschränken.

Die erzeugten Pyramidingpopulationen, in denen die beiden Resistenzgene *Zym-1* und *zym-4* kombiniert sind, wurden in der F5-Generation einem Infektionstest unterzogen. Aus drei F3-Populationen sind 13 Linien hervorgegangen (Pyr-1a, b u. c in Tabelle 2), die bereits einen deutlich erhöhten Grad an Resistenz mit einem Boniturmittelwert von 2,8 aufwiesen. Die resistente Ölkürbislinie nur mit *zym-4* zeigte ein Boniturmittel von 4,5, die mit *Zym-1* einen Wert von 4,0 (Tabelle 2).

In unserem zweiten Pyramidingexperiment konnten wir bereits drei Resistenzgene kombinieren, da wir für zwei davon (*Zym-1* und *Zym-2*) molekulare Marker zur Verfügung hatten. Auch in diesem Versuch standen uns, für die Überprüfung im Infektionstest, 13 Linien aus drei F3-Populationen zur Verfügung. Die drei Resistenzgene lassen sich in verschiedenen Kombinationen zusammenfügen. Linien, die das dominante Resistenzgen *Zym-1* in Kombination mit dem rezessiven Gen *zym-4* besitzen (Pyr-2a in Tabelle 2), sind als Wiederholung des ersten Versuchs zu betrachten und unterscheiden sich von diesem auch in ihren Boniturmitteln nicht.

Linien mit der Kombination der drei Resistenzgene *Zym-1*, *Zym-2* und *zym-4* (Pyr-2c) erreichten erwartungsgemäß den höchsten Grad an Resistenz (Boniturmittel 2,2).

Interessanterweise erreichten Linien, die das rezessive Resistenzgen *zym-4* in Kombination mit dem Modifikator *Zym-2* besitzen (Pyr-2b), ebenfalls ein besseres Resistenzniveau (3,4) als die Ausgangslinie Ölk. NL1-Res (4,5) mit *zym-4*. Genotypen mit dem Resistenzgen *Zym-2* bei Abwesenheit von *Zym-1* sind anfällig, da *Zym-2* nur als ergänzender Modifikator zu *Zym-1* wirkt. Hier wurde die Wirkung eines Resistenzgens aus Nigerian Local (*zym-4*) durch ein Modifikatorgen aus Menina (*Zym-2*) verstärkt (Tabelle 2).

In weiteren Versuchen gelang es uns schließlich vier Resistenzgene in einem Genotyp zu kombinieren.

Pflanzen aus Pyr-3, mit den beteiligten Resistenzgenen *Zym-1*, *Zym-2*, *zym-4* und *zym^{mos}*, erreichten in einem ersten

Tabelle 2: Mittlere Boniturnote der verwendeten Resistenzquellen und den daraus entstandenen Zuchtlinien. Die Klassifizierung der Symptome erfolgte unter Verwendung einer Skala von 0-9, wobei Pflanzen mit der Boniturnote 0 als nicht infiziert, 1-4 als resistent und 6-9 als anfällig bewertet wurden. Die Boniturnote 5 stellt eine nicht eindeutig zuordenbare Übergangssituation dar.

Genotyp	Resistenzgen(e)	Boniturnittel
Nigerian Local	<i>Zym-0</i> + <i>zym-4</i>	0,5
Menina 15	<i>Zym-1</i> (+ <i>Zym-2</i> + <i>Zym-3</i>)	2
Soler	<i>zym^{mos}</i>	3
Ölkürbis	keine	7,4
Zucchini Tigress	<i>zym-4</i>	4,5
Ölk. NL1-Res	<i>zym-4</i>	4,5
Zucchini TRF res.	<i>Zym-1</i> + <i>Zym-2</i> + <i>Zym-3</i>	4
Ölk. Men1-Res	<i>Zym-1</i> (+ <i>Zym-2</i> + <i>Zym-3</i> ?)	4
Ölk. Sol-Res	<i>zym^{mos}</i> (+ <i>Zym-3</i> ?)	2,5
Ölk. NL2-Res	<i>Zym-0</i> + <i>zym-4</i>	1,7
Pyr-1a	<i>Zym-1</i> + <i>zym-4</i>	2,8
Pyr-1b	<i>Zym-1</i> + <i>zym-4</i>	2,7
Pyr-1c	<i>Zym-1</i> + <i>zym-4</i>	2,8
Pyr-2a	<i>Zym-1</i> + <i>zym-4</i>	2,7
Pyr-2b	<i>Zym-2</i> + <i>zym-4</i>	3,4
Pyr-2c	<i>Zym-1</i> + <i>Zym-2</i> + <i>zym-4</i>	2,2
Pyr-3	<i>Zym-1</i> + <i>Zym-2</i> + <i>zym-4</i> + <i>zym^{mos}</i>	2,5
Pyr-4	<i>Zym-1</i> + <i>Zym-2</i> + <i>Zym-0</i> + <i>zym-4</i>	1,5

Infektionstest ein dem ersten Versuch mit zwei kombinierten Resistenzgenen vergleichbares Resistenzniveau (2,5). Wenn man berücksichtigt, dass *zym-4* und *zym^{mos}* rezessive Resistenzgene sind, und diese erst im homozygoten Zustand voll zur Ausprägung kommen, kann man erwarten, dass sich das Resistenzniveau nach einer Selbstung noch weiter verbessert.

Pflanzen aus Pyr-4, mit den beteiligten Resistenzgenen *Zym-1*, *Zym-2*, *zym-4* und *Zym-0*, erreichten das bisher höchste Resistenzniveau (1,5 Tabelle 2). Auch in dieser Kombination ist noch eine Steigerung zu erwarten, wenn *zym-4* im homozygoten Zustand voll zur Ausprägung kommt.

Markerselektierte F2-Pflanzen der beiden zuletzt beschriebenen Kreuzungskombinationen, sowie F1-Pflanzen einer Zweifachhybride (mit allen fünf Resistenzgenen) konnten wir bisher nur am Feld beobachten. Es hat sich jedoch schon dabei gezeigt, dass diese Pflanzen ein sehr hohes Resistenz-

niveau haben, sie blieben über die gesamte Vegetationsperiode symptomfrei. Alle anderen Pflanzen am gleichen Feld, wiesen ein ihrer genetischen Konstitution entsprechendes Krankheitsbild auf, alle diese Pflanzen entwickelten mehr oder weniger starke Virussympptome.

Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse unserer hier vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass die Kombination mehrerer ZYMV-Resistenzgene in Ölkürbis einen additiven Effekt hat. Während Ölkürbislinien mit nur einem Resistenzgenen einen mittleren Boniturnote von 4,5 haben, erreichen Genotypen mit vierfacher Resistenz die Durchschnittsnote von 1,5.

Danksagung

Die Arbeiten wurden vom BMLFUW und später in Kooperation mit der Saatzucht Gleisdorf GmbH im Rahmen mehrerer Forschungsprojekte (FFF und FFG) finanziert.

Literatur

- GONG, L., STIFT, G., KOFLER, R., PACHNER, M. and LELLEY, T., 2008: Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L., Theor. Appl. Genet. 117, 37-48.
- PACHNER, M. and T. LELLEY, 2004: Different genes for resistance to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) in *Cucurbita moschata*. In: A. Lebeda and H.S. Paris (eds.), Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. Proc. *Cucurbitaceae* 2004. Palacky Univ., Olomouc, Czech Republic. pp, 237-243.
- PARIS, H.S. and R.N. BROWN, 2005: The genes of pumpkin and squash, HortScience 40, 1620-1630.
- PARIS, H.S. and S. COHEN, 2000: Oligogenic inheritance for resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita pepo*, Ann. Appl. Biol. 136, 209-214.
- PROVVIDENTI, R., 1997: New American summer squash cultivars possessing a high level of resistance to strains of zucchini yellow mosaic virus from China, Cucurbit Genet. Coop. Rep. 20, 57-58.
- RIEDLE-BAUER, M., 1998: Ölkürbis & Co.: Was tun gegen das Zucchini gelbmosaikvirus? Der Pflanzenarzt 4/98, 1-4.
- WERNER, K., W. FRIEDT and F. ORDON, 2005: Strategies for Pyramiding Resistance Genes Against the Barley Yellow Mosaic Virus Complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2), Mol. Breeding 16, 45-55.
- WHITAKER, T.W. and R.W. ROBINSON, 1986: Squash breeding, Breeding Vegetable Crops, M. J. Bassett, ed. AVI Publishing Co, pp, 209-242.

Züchtung eines neuen Körneramaranthgenotyps - Vorgangsweise und Ergebnisse Breeding of a new genotype of grain amaranth - methodology and results

Georg Dobos¹ und Daniela M. Gimplinger²

Abstract

Grain amaranth is a niche crop which deserves closer attention due to its valuable grain components. When introducing a new crop, genotypes adapted to regional growing conditions have to be developed. This is especially evident with respect to seed maturation and plant dry down of a warm-season crop grown in a region with a temperate climate.

In Austria, the breeder G. DOBOS started breeding of amaranth in 1986. A huge variability of amaranth entries from several gene banks was available. Breeding targets were set in the following order of priority: early grain maturation, dry down of the plant, rapid juvenile growth, reduced plant height, resistance to lodging, large seed size and high popping quality. Single-plant selection resulted in the medium-late genotype AMAR which yielded well but did not show satisfying plant dry down, suitability for mechanical harvest and seed size. As seed maturation and plant dry down could not be improved by selection, cross breeding was started. This breeding program resulted in the genotypes NEUER TYP and ANDERER TYP.

Field experiments were carried out under semiarid conditions in Eastern Austria between 2002 and 2005. The objective was to compare the genotypes NEUER TYP, ANDERER TYP and AMAR (developed by Dobos) and the genotype MITTLERER TYP (developed by Baji, Tapioszele, Hungary). The developed lines differed with respect to plant height (70-170 cm), temperature sum from sowing to harvest (2000-2700°Cd), grain moisture at harvest (21-38%), thousand seed weight (0.6-1.0 g), content of crude protein (15.2-18.6%) and crude fat (5.4-8.6%), and harvestable grain yield (1600-3000 kg ha⁻¹ dry matter). The genotype NEUER TYP was characterised by reduced plant height (70-100 cm), early plant dry-down (after a temperature sum of 2000-2200°C) and early seed maturation with reduced seed moisture at harvest (21-24%), satisfying seed size and thousand seed weight (0.9-1.0 g dry matter) and high harvestable yield (1800-3000 kg ha⁻¹ dry matter).

Keywords: grain amaranth, breeding, yield, maturity, quality

Einleitung

Botanik und Verwendung

Amaranthus-Arten, die zur Familie der Fuchsschwanzgewächse gehören, können als Körnerfrüchte, als Gemüse oder als Zierpflanzen genutzt werden, hochwüchsige Formen auch als Futter- und Energiepflanzen. Für die Körnernutzung, die in diesem Beitrag behandelt wird, werden folgende Arten herangezogen: *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* und *A. caudatus*. Wie Buchweizen (*Fagopyrum esculentum*) und Quinoa (*Chenopodium quinoa*) wird Körneramaranth zu den „Pseudocerealien“ gezählt, weil seine kohlehydratreichen Körner ähnlich wie Getreide verwendet werden.

Amaranth als „Alternativkultur“ in Österreich

Mit der Züchtungsarbeit, wozu im weiteren Sinne auch die Prüfung von über 100 Herkünften gehörte, begann Dobos bereits 1986 (DOBOS 1992, DOBOS 1997). Anlass dafür war eine Anfrage aus der Industrie bzw. die Entwicklung des

Marktes, der sich damals für neue Pflanzen und Produkte öffnete. Das Interesse für „gesunde Ernährung“ rückte auch Amaranth-berechtigerweise - durch den Proteingehalt (13-19%) mit hohem Anteil an essentiellen Aminosäuren (vor allem an Lysin), durch das wertvolle Öl (5-8%) und durch den hohen Gehalt an Ca, Mg und Fe sowie Ballaststoffen ins Rampenlicht. Darüber hinaus bietet Amaranth aufgrund seiner Glutenfreiheit für Zöliakieerkrankte eine Alternative zu Getreideprodukten. Es entstand eine Marktnische - bis heute ist Amaranth ein Nischenprodukt geblieben - und gleichzeitig die Nachfrage nach Saatgut für den Anbau unter österreichischen Bedingungen.

Zuchtziele

Amaranthherkünfte weisen eine Reihe an Eigenschaften auf, die für Wildpflanzen charakteristisch sind. Eigene Untersuchungen an verschiedenen Herkünften (siehe Linienzüchtung) führten zur Formulierung von Zuchtzielen mit folgender Priorität: frühe Kornreife, Abreife der Pflanzen, niedriger Wuchs, Standfestigkeit, rasche Entwicklung nach dem Aufgang, großes Korn und gutes Popverhalten. Weitere Zuchtziele umfassen einen höheren Proteingehalt

¹ ZENO PROJEKTE, Veterinärmedizinische Universität Wien, Institut für Angewandte Botanik und Pharmakognosie, Veterinärplatz 1, A-1210 WIEN

² Universität für Bodenkultur, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Gregor-Mendel-Straße 33, A-1180 WIEN

* Ansprechpartner: Dr. Georg DOBOS, zenoprojekte@aon.at



Abbildung 1: Variabilität innerhalb einer Herkunft

und einen hohen Gehalt an essentiellen Aminosäuren, Ausfallfestigkeit des Kornes, Kältetoleranz und einen geringen Verzweigungsgrad des Fruchtstandes.

Züchtungsmethodik

Prüfung von Herkünften - Linienzüchtung

Dank verschiedener Genbanken, vor allem dank des Rodale Research Centers (USA), stand eine sehr große genetische Variabilität zur Verfügung, sowohl zwischen den Herkünften als auch innerhalb der Herkünfte (Abbildung 1). Bei den Herkünften handelte es sich zumeist um Landsorten, teilweise aber auch um aus gezielter Kreuzungszüchtung hervorgegangene Sorten. Somit war es nahe liegend, mit einer Einzelpflanzenauslese und Pedigree-Züchtung zu beginnen, um ein möglichst rasches Ergebnis zu erzielen. Die Variabilität im Blühbeginn erstreckte sich von früh bis sehr spät, wobei einige wenige Kurztagpflanzen keinen (vor allem *A. caudatus* aus Südamerika) oder geringen Samenansatz zeigten.

Es wurde sehr bald klar, dass Amaranth als „Halbkulturpflanze“ unter Bedingungen des gemäßigten Klimas nicht abreift. Als erstes Ergebnis entstand die Selektion AMAR, ein *A. cruentus* des sogenannten „Mexikanischen Typs“, mit der 1989 die Produktion von einigen ha Amaranth begonnen werden konnte (Abbildung 2). Als mittelspäter Genotyp bewährte er sich vor allem im nördlichen Weinviertel, wo bei geeigneten pflanzenbaulichen Maßnahmen wie hoher Bestandesdichte und Wahl von trockenen Standorten mit leichten, eher mageren Böden eine Abreife erreicht werden konnte, die allerdings sehr spät, oft erst im November, erfolgte. Die späte Ernte führte häufig zu einem Zusammenbruch der Bestände und zu einer Verschlechterung der Kornqualität. In den folgenden Jahren wurde AMAR jährlich auf bis zu 100 ha eingesetzt und diente in Züchtungsversuchen als Standardsorte. Bei entsprechendem Management und guter Trocknung kann ein qualitativ wertvolles Korn geerntet werden, das sich zum Aufpoppen eignet. Dagegen bereiten die langsame Anfangsentwicklung, die deutlich durch die

Temperatur bestimmt wird, und der Konkurrenzdruck durch Unkrautamaranth große Schwierigkeiten in der Produktion, die dadurch auch mit viel Handarbeit verbunden ist. Die Abreife und der Druschzeitpunkt sind von der Witterung abhängig und variieren stark von Jahr zu Jahr.

Kreuzungszüchtung -

Entwicklung des Genotypes NEUER TYP

Trotz der hohen vorliegenden genetischen Vielfalt konnte bis 1998 keine Verbesserung des Abreifeverhaltens erzielt werden. Daher wurde nun mit der Kreuzungszüchtung begonnen. Die Mutterpflanze des neuen Zuchtprogrammes war eine extrem früh blühende Einzelpflanze, die in einer aufspaltenden späten Herkunft auftrat. Solche „Frühblüher“ treten relativ oft in Herkünften auf, sind aber als reine Linien ungeeignet, weil sie stark zu Lagerung neigen und nicht leistungsfähig im Ertrag sind.

Als Pollenspender diente eine spätreife und hochwüchsige, aber standfeste Selektion mit sehr großen Samen. Die Kreuzung wurde im Glashaus mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesäten Pflanzen durchgeführt. Aufgrund eines Markers wurde die nachfolgende F_1 -Generation ausgelesen.



Abbildung 2: Genotyp AMAR

Tabelle 1: Herkunft und Eigenschaften von angepassten Genotypen

Genotyp	Art	Herkunft	Wuchshöhe (cm)	Form	Fruchtstand	Farbe
NEUER TYP	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Kreuzung	70-100	stark verzweigt		grün
ANDERER TYP	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Keuzung	80-140	apikale Dominanz		grün
MITTLERER TYP	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Kreuzung (B. Baji, Inst. for Agrobotany, Tapioszele, Ungarn)	120-170	locker mit apikaler Dominanz		orange/rot
AMAR	<i>Amaranthus cruentus</i>	Selektion aus RRC 1041 (Rodale Research Center)	120-170	apikale Dominanz		grün

Tabelle 2: Saattermin, Temperatursumme (Basis = 0°C), Vegetationstage bis zur Ernte und Kornfeuchte zur Ernte (Feldversuche zwischen 2002 und 2005)

Genotyp	Saattermin	Temperatursumme (Saat bis Ernte) (°C d)	Vegetationstage (Saat bis Ernte)	Kornfeuchte zur Ernte (%)
NEUER TYP		1950-2200	92-117	21-24
ANDERER TYP	29. April -	2100-2300	109-119	22-24
MITTLERER TYP	27. Mai	2350-2550	110-129	27-28
AMAR		2400-2700	117-145	30-38

Zunächst lag der Schwerpunkt der Selektion auf rot pigmentierten Linien, bis sich herausstellte, dass unpigmentierte Pflanzen deutlich besser abreifen und größere Samen mit einem besseren Popverhalten bilden.

Durch eine Abfolge von mehreren Generationen im Glashaus konnte nach etwa 3 Jahren (etwa F7) die Sorte NEUER TYP fertig gestellt werden, die sich auch im Anbau bewährt hat: Dieser Genotyp reift - je nach Umweltbedingungen - bereits im August oder aber spätestens Ende September ab. Er zeichnet sich durch gutes Popverhalten und durch ein hohes Tausendkorngewicht aus (siehe Tabelle 3). Im praktischen Anbau erreicht er mit durchschnittlich etwa 2000 kg ha⁻¹ den Ertrag von AMAR, weist geringere Körnerverluste und deutlich niedrigere Kornfeuchten (siehe Tabelle 2) bei der Ernte auf. Im NEUEN TYP traten vereinzelt Pflanzen mit unverzweigten Fruchtständen auf. Diese führten zur Selektion ANDERER TYP.

Prüfung ausgewählter Genotypen im Feldversuch

In den Jahren 2002 bis 2005 wurden an der Versuchswirtschaft der Universität für Bodenkultur in Groß-Enzersdorf

Körneramaranthgenotypen in unterschiedlichen Saaddichten geprüft. Ziel war es, das Abreifeverhalten, das Ertragspotential, den Ernteindex, den maschinell erntbaren Ertrag sowie die Kornzusammensetzung verschiedener Genotypen zu vergleichen. Untersucht wurden die von Dobos entwickelten Genotypen NEUER TYP, ANDERER TYP und AMAR sowie der Genotyp MITTLERER TYP aus Tapioszele in Ungarn (GIMPLINGER et al. 2008).

Ergebnisse: Abreife, Ertrag und Qualität

Die Genotypen unterschieden sich in morphologischen Eigenschaften (Tabelle 1), im Abreifeverhalten (Tabelle 2), im Ertrag (Tabelle 3) und in der Kornzusammensetzung (Tabelle 4). Der stark verzweigende NEUE TYP stellte sich als besonders kurzwüchsig heraus (70-100 cm), wodurch die maschinelle Ernte erleichtert wird. Der ANDERE TYP zeigte eine mittlere Wuchshöhe, während der rot blühende MITTLERE TYP und AMAR eine Bestandeshöhe bis zu 170 cm erreichten.

Der Zeitpunkt der Kornreife und die Abreife der Pflanzen variierten stark zwischen den geprüften Versuchsgliedern: Der NEUE TYP als der frühreifste Genotyp konnte etwa nach einer Wärmesumme von 2000°C geerntet werden, die

Tabelle 3: Kornertrag, Ernteindex and Kornertragskomponenten (Mittel über fünf Pflanzendichten)

Jahr	Genotyp	Kornertrag* (Handernte) (g TM m ⁻²)	Kornertrag* (Drusch) (g TM m ⁻²)	Ernteindex	Beobachtete Dichte (Pfl. m ⁻²)	Kornzahl pro Pflanze	TKG* (g TM)
2002	NEUER TYP	239 a	181 b	0.39 a	8-135	16000 a	0.96 a
	MITTLERER TYP	219 a	156 c	0.26 b	7-86	21900 a	0.63 b
	AMAR	216 a	238 a	0.25 b	6-119	20000 a	0.66 b
2003	NEUER TYP	282 a	306 a	0.26 a	9-58	13500 b	1.04 a
	MITTLERER TYP	215 a	215 c	0.18 b	9-34	29800 a	0.55 b
	AMAR	289 a	277 b	0.18 b	10-36	23700 a	0.67 b
2004	NEUER TYP	295 a	252 a	0.38 a	10-80	16500 b	0.86 a
	ANDERER TYP	204 b	209 b	0.26 b	9-82	11700 c	0.83 a
	AMAR	290 a	264 a	0.27 b	8-92	22000 a	0.60 b
2005	NEUER TYP	241 a	222 a	0.37 a	7-54	16200 b	0.91 a
	ANDERER TYP	201 b	207 ab	0.31 b	8-63	12100 b	0.89 a
	AMAR	235 a	173 b	0.25 c	8-52	24300 a	0.59 b

* Trockenmasse

SNK, P=0.05 (ANOVA pro Jahr)

Tabelle 4: Kornzusammensetzung

Jahr	Genotyp	Rohprotein (N x 6.25) (%)	Rohfett (%)	Rohfaser (%)	Asche (%)	Kohlehydrate (%)
2002	NEUER TYP	15.76 b	6.08 c	3.77 a	3.12 ab	71.27 a*
	MITTLERER TYP	18.55 a	7.29 b	4.22 a	3.23 a	66.71 b
	AMAR	16.39 b	8.60 a	3.96 a	3.04 b	68.01 b
2003	NEUER TYP	15.22 c	5.40 c	3.94 a	2.73 b	72.72 a
	MITTLERER TYP	17.55 a	6.64 b	4.10 a	2.99 a	68.71 c
	AMAR	15.79 b	7.35 a	3.54 a	2.71 b	70.61 b

* SNK, P = 0.05 (ANOVA pro Jahr)

unter den gegebenen Bedingungen im Osten Österreichs etwa Ende August erreicht wurde. Zum Erntezeitpunkt lag die Kornfeuchte zwischen 21 und 24%. Der ANDERE TYP blühte etwa eine Woche später als der NEUE TYP, zeigte aber ein ähnliches Abreifeverhalten. Der MITTLERE TYP reifte etwa zwei Wochen später, der mittelspäte AMAR konnte erst nach einer Wärmesumme von mehr als 2400°C geerntet werden. Diese Summe wurde am Standort etwa Anfang bis Mitte Oktober erreicht. Zu diesem Zeitpunkt war der Bestand noch immer nicht abgetrocknet, und die Kornfeuchte lag zwischen 30 und 38%. Ein Nachrocknen des Erntegutes war also in allen Fällen notwendig, erforderte aber beim NEUEN TYP einen geringeren Energieaufwand und führte zu höherer mikrobiologischer Qualität (GIMPLINGER et al. 2007).

Von Hand geerntete Erträge der Genotypen schwankten zwischen 2000 und 3000 kg ha⁻¹ Kornertrag (Trockenmasse). Der frühreife NEUE TYP und der mittelspäte AMAR erreichten das gleiche Ertragsniveau, zeigten sich aber den anderen Prüfgliedern überlegen. Die Druscherträge lagen zwischen 1600 und 3000 kg ha⁻¹ (Trockenmasse).

Auch hier wurde der Ertragsvorteil von den Genotypen AMAR und NEUER TYP deutlich. Kornverluste vor und während des Druschvorganges - berechnet als die Differenz zwischen Handernte- und Druscherträgen - lagen im Mittel bei 8%, waren aber stark von Umweltbedingungen abhängig und variierten zwischen 0 und 29%.



Abbildung 3: Vergleich der Abreife der Genotypen AMAR und NEUER TYP

Der kurzwüchsige NEUE TYP zeigte einen deutlich höheren Ernteindex (bis zu 0.38) als die anderen Genotypen. Bei der Analyse der Ertragskomponenten wurde deutlich, dass sich die Pflanzen nicht nur im Korngewicht, sondern auch in der Kornzahl pro Pflanze unterscheiden. Während sich der NEUE TYP und der ANDERE TYP durch große, schwere Körner mit einem Tausendkorngewicht von beinahe 1 g (Trockenmasse) auszeichneten, zeigten der MITTLERE TYP und AMAR nur ein Tausendkorngewicht um 0.6 g (Trockenmasse). Der hohe Kornertrag des NEUEN TYP basierte auf großen, schweren Körnern, während der hohe Ertrag von AMAR durch eine größere Kornzahl pro Pflanze zustande kam.

Der Rohproteingehalt variierte zwischen 15 und 19%, der Gehalt an Rohfett zwischen 5 und 9%. Der kleinkörnige MITTLERE TYP zeigte den höchsten Rohproteingehalt, der kleinsamige AMAR den höchsten Rohfettgehalt. Beim Vergleich von drei Genotypen ging eine zunehmende Korngröße mit einem reduzierten Proteingehalt und einem höheren Gehalt an Kohlehydraten einher. Zunehmende Korngröße ist offensichtlich vor allem mit einer Zunahme des stärkereichen Perisperms verbunden.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigte besonders der NEUE TYP eine Reihe an agronomischen Vorteilen: Der Genotyp ist niedrigwüchsig und reift früh ab, was den Mähdrusch erleichtert. Er zeigt ein ähnliches Ertragspotential wie der mittelspäte AMAR, bietet aber den Vorteil von deutlich geringerer Kornfeuchte bei der Ernte. Darüber hinaus zeichnen sich die Samen durch ein hohes Tausendkorngewicht und ein gutes Popverhalten aus.

Literatur

- DOBOS, G., 1992: Körneramaranth als neue Kulturpflanze in Österreich. Einführung und züchterische Aspekte. PhD-thesis, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna.
- DOBOS, G., 1997: Züchterische Bearbeitung von Körneramaranth, Quinoa und Wintermohn unter Berücksichtigung der im Laufe der Einführung auftretenden Fragen. Forschungsprojekt L 819/93. Institute of Applied Botany, University of Veterinary Sciences, Vienna.
- GIMPLINGER, D.M., G. SCHULTE auf'm ERLEY, G. DOBOS and H.-P. KAUL, 2008: Optimum crop densities for potential yield and harvestable yield of grain amaranth are conflicting. *European Journal of Agronomy* 28, 119-125.
- GIMPLINGER, D.M., G. DOBOS, R. SCHÖNLECHNER, H.-P. KAUL, 2007: Yield and quality of grain amaranth (*Amaranthus* sp.) in Eastern Austria. *Plant, Soil and Environment* 53, 105-112.

Züchtung von chinesischen Heilpflanzen für den heimischen Anbau

Heidi Heuberger^{1*} und Ulrich Bomme¹

Abstract

Breeding work on several medicinal plant species used in the traditional Chinese medicinal therapy (TCM) and cultivated in Germany was started in 2004. The breeding work aims to improve the available seed provenances for yield, homogeneity and quality of the raw materials. In addition to selection and field testing, basic questions related to flowering and fertilization had to be answered as well as methods for vegetative propagation had to be developed.

Keywords: breeding, chemical constituents, Chinese medicinal plants, homogeneity, winter hardiness

Einleitung

Anwendung chinesischer Heilpflanzen in Deutschland

Heilpflanzen spielen in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) eine zentrale Rolle. Mittlerweile wenden etwa 3000 speziell ausgebildete deutsche Ärzte (und andere Heilberufe) die chinesische Arzneimitteltherapie an, Tendenz steigend. Großhändler versorgen spezialisierte Apotheker mit importierter Ware, die die ärztlichen Verordnungen mischen und als Rezepturarzneimittel herstellen. Der Import der Rohdrogen (getrockneter Pflanzenteile) vieler bei uns meist unbekannter Pflanzen aus Asien bereitet aber häufig Qualitäts- und Beschaffungsprobleme (9) - vor allem im Hinblick auf eine gut dokumentierte „Entstehungsgeschichte“, wie sie heute bei westlichen Arzneipflanzen wie Pfefferminze oder Baldrian Standard ist. Durch einen Anbau von Heilpflanzen mit definierter Herkunft unter kontrollierten und dokumentierten Bedingungen können die Arzneimittelsicherheit und die allgemeine Qualität des Drogenmaterials wesentlich verbessert werden. Gleichzeitig soll der Umfang des deutschen Heil- und Gewürzpflanzenanbaus durch die Schaffung neuer Anbaumöglichkeiten erweitert und der Raubbau an den Naturstandorten in China reduziert werden (8).

Interdisziplinäres Projekt seit 1999

Um chinesische Arzneipflanzen unter kontrollierten Bedingungen anbauen zu können, beschäftigt sich die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) unter der Leitung von Prof. BOMME seit 1999 mit der systematischen Anbauforschung von 19 ausgewählten Arten.

Eingebunden in das Projekt sind der Bereich Pharmakognosie des Instituts für Pharmazeutische Wissenschaften der Karl-Franzens-Universität Graz (Prof. BAUER), der Bereich Systematische Botanik des Department Biologie I der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU, Prof. HEUBL), die Gesellschaft für die Dokumentation von Erfahrungsmaterial der Chinesischen Arzneitherapie (DECA, Dr. FRIEDL), die Kliniken SiLiMa (Riedering, Dr. FRIEDL) und Am Steigerwald (Gerolzhofen, Dr. SCHMINCKE), die „Internationale Gesellschaft für Chinesische Medizin“ (Societas Medicinae Sinensis, SMS, Dr. HUMMELBERGER) sowie die Firma Saatzucht Steinach (Steinach, Dr. EICKMEYER). Die Firmen PhytoLab (Vestenbergsgreuth, Dr. KABELITZ, Dr. SCHMÜCKER) und Kräuter Mix (Abtswind, Dr. TORRES-LONDONO) führen seit 2004 umfangreiche vergleichende Untersuchungen zur Qualität und Sensorik an importierten und aus Versuchsanbau stammenden Drogen durch.

Für acht der Arten konnten die Anbauverfahren so weit entwickelt werden, dass im Arzneipflanzenanbau versierte Landwirte seit 2005 diese TCM-Drogen in Bayern für TCM-Handelsfirmen erzeugen (3). Hierzu steht jeweils eine Saatgutherkunft zur Verfügung, deren botanische Identität gesichert ist, und die einen guten Ertrag und Inhaltsstoffgehalt aufweist.

Diese Saatgutherkünfte besitzen jedoch noch weitgehend ihren Wildpflanzencharakter, was sich u.a. in der Variabilität des Pflanzenmaterials ausdrückt. Zudem führten die pflanzenbaulichen Maßnahmen nicht bei allen Arten zum ausreichenden Erfolg. Daher wurde 2004 bei *Artemisia scoparia*, *Astragalus mongholicus*, *Bupleurum chinense*, *Leonurus japonicus*, *Salvia miltiorrhiza* (seit 2007) und *Saposhnikovia divaricata* (seit 2008) der Weg der Pflanzenzüchtung beschritten, an dessen Ende verbesserte Sorten den heimischen Anbau wirtschaftlicher oder sogar erst möglich machen sollen (vgl. *Tabelle 1*).

Vorgehensweise und Ergebnisse

Ausgangsmaterial

Die Grundvoraussetzungen erfolgreicher Züchtung sind aussichtsreiches Pflanzenmaterial, das die gewünschten Eigenschaften enthält, sowie das Wissen über die Blüh- und Befruchtungsverhältnisse der Pflanzenart, damit das Zuchtverfahren zielführend gestaltet werden kann. Zur Erweiterung des Ausgangsmaterials wurden, zusätzlich zu den schon vorhandenen Saatgutherkünften aus den

¹ Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Arbeitsgruppe Heil- und Gewürzpflanzen, Vöttinger Straße 38, D-85354 FREISING

* Ansprechpartner: Dr. Heidi HEUBERGER, heidi.heuberger@LfL.bayern.de

Tabelle 1: Ziele für die züchterische Bearbeitung ausgewählter chinesischer Heilpflanzen

Pflanzenart	Zuchtziele	Verwendetes Pflanzenteil
<i>Artemisia scoparia</i>	Niedriger Cadmiumgehalt, hoher Ertrag, Homogenität	Blätter
<i>Astragalus mongholicus</i>	Hoher Ertrag bei einjähriger Kultur, dicke Wurzeln, hoher Astragalosid IV-Gehalt	Wurzeln
<i>Bupleurum chinense</i>	Winterhärte - dadurch zweijährige Kultur und höherer Ertrag (Art noch nicht im Praxisanbau)	Wurzeln
<i>Leonurus japonicus</i>	Homogenität des Blühbeginns, hoher Ertrag, Winterhärte für zweijährigen Anbau	Kraut, bei Blühbeginn
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Krankheitstoleranz, Ertrag, Homogenität in Blütenbildung, wenig Feinwurzeln	Wurzeln
<i>Saposhnikovia divaricata</i>	Winterhärte und zuverlässige Blüte im zweiten Jahr für Saatgutproduktion, schnelle und gute Keimung	Wurzeln

Forschungsarbeiten zur Inkulturnahme, weitere Akzessionen vor allem von Genbanken und von Wildstandorten zusammengetragen und auf ihre botanische Identität und prinzipielle Eignung für die Züchtung untersucht.

Durchführung

Die Feldversuche wurden auf den Versuchstationen Bau mannshof (Lkr. Pfaffenhofen) und Puch (Lkr. Fürstenfeldbruck) der LfL, sowie auf Versuchsfeldern der Saatzucht Steinach (Lkr. Straubing) durchgeführt. Die Vermehrung der Pflanzen, molekularbiologische Untersuchungen und Gehaltsbestimmungen erfolgten in den Arbeitsgruppen IPZ 1a, 5c, 3d und AQU 2 der LfL, sowie bei den Partnern an der LMU, Universität Graz und im Labor von PhytoLab.

Blüh- und Befruchtungsbiologie

Für die zweite Voraussetzung, das Wissen über die Blüh- und Befruchtungsverhältnisse, müssen bei den chinesischen Heilpflanzen, im Gegensatz zu einer alten Kulturart wie Weizen, die wichtigsten Fragen der Fortpflanzungsbiologie erst noch geklärt werden, z.B. ob es sich um Fremd- oder Selbstbefruchter handelt, wann die Herkünfte blühen oder wodurch die Blütenbildung induziert werden kann. Es ist zwar anzunehmen, dass dieses Wissen in China teilweise besteht, jedoch war es für uns nicht zugänglich. Durch die Kontrolle der Bestäubungsmöglichkeiten (frei, ohne Insekten oder isoliert) wurde festgestellt, dass auf Grund des deutlich höheren Saatgutertrags aller Arten bei ungehinderter Bestäubung, sowie des starken Insektenbesuchs bei *Astragalus*, *Bupleurum*, *Leonurus*, *Salvia* und *Saposhnikovia* und der Blütenmorphologie von *Artemisia* die Fremdbefruchtung überwiegt. Für *Artemisia* konnte die nahezu vollständige Fremdbefruchtung mit Hilfe polymorpher Banden (AFLP) nachgewiesen werden (6).

Synthetische Sorte aus Klonen

Als Züchtungsverfahren wurde die Entwicklung einer synthetischen Sorte auf der Basis von Klonen gewählt, das bei der Züchtung an *Arnica montana* bereits erfolgreich eingesetzt wurde (2, 4). *Artemisia* und *Salvia* können gärtnerisch über Stecklinge vermehrt werden, für *Leonurus* und *Astragalus* war nur die *in-vitro* Vermehrung über Nodien-segmente mit einem eigens für diese Arten entwickelten Protokoll möglich (1).

Im ersten Schritt wurden vor allem aus Beständen der ursprünglich vorhandenen Saatgutherkünfte Elitepflanzen mit besonderen, gewünschten Eigenschaften selektiert und geklont. Um Zeit zu sparen, wurden die Klone von *Artemisia*, *Leonurus* und *Astragalus* im Polycross geprüft und

gleichzeitig gekreuzt. Diese Anlageform bedeutet zwar die perfekte Randomisierung für die Klonprüfung, der Arbeitsaufwand für die Bonituren war jedoch sehr groß. Außerdem ging auch Pollen von weniger geeigneten Klonen in die Pollenwolke ein. Dennoch kann anhand der F_1 -Nachkommen die allgemeine Kombinationseignung der Klone geprüft werden, wenn auch auf etwas niedrigerem Leistungsniveau. Für neu selektierte Klone von *Astragalus* und für *Salvia* werden auf Grund des Arbeitsaufwands Klonprüfung und Klonkreuzung wieder nacheinander durchgeführt.

Bei der Klonprüfung zeigten z.B. die 42 Klone von *Artemisia scoparia* eine große Variationsbreite im Cadmiumgehalt von 0,24 bis 0,96 mg Cd/kg Droge und im Gehalt an Ätherischem Öl von 0,13 bis 1,09 %. Einige Klone wiesen sowohl einen niedrigen Cd-Gehalt als auch einen hohen Ätherischölgehalt auf. Außerdem bildeten bei *Astragalus mongholicus* einige Klone schon im ersten Jahr besonders große und dicke Wurzeln aus. Für weitere Details sei auf die Forschungsberichte des Projekts (5, 7) verwiesen.

Aktuell werden die zweijährigen Leistungsprüfungen der Klon-Nachkommen von *Leonurus*, *Astragalus* und *Artemisia* an zwei Standorten durchgeführt. Bei allen Arten scheinen günstige Linien im Sortiment enthalten zu sein. Das Zuchtziel Winterhärte wird bei *Leonurus* jedoch nicht zu erreichen sein, da insgesamt nicht ausreichend Pflanzen überwintern, um im Folgejahr das Unkraut effektiv zu unterdrücken.

Populationsverbesserung durch Individualauslese

Bupleurum konnte zunächst nicht vegetativ vermehrt werden, daher wurde bei dieser Art und bei *Saposhnikovia* (beides Arten der *Apiaceae*) der Weg zur Populationsverbesserung mittels Prüfung der Einzelpflanzennachkommenschaften eingeschlagen. Beide Arten bilden bei der Isolation von Einzelpflanzen keine Samen aus. Der Einsatz von Stubenfliegen führte bei isolierten *Bupleurum*-Einzelpflanzen jedoch zum Samenertrag. Dieses Verfahren muss bei *Saposhnikovia* noch getestet werden.

Bei der Prüfung von S_1 -Nachkommenschaften der *Bupleurum*-Eliten starben bereits im Sommer viele Pflanzen ab. Es werden Inzuchtdepressionen vermutet, eventuell lagen auch Saatgutprobleme vor. Anhand des in 2008 im Gewächshaus neu erzeugten S_1 -Saatguts von *Bupleurum* soll überprüft werden, ob die Ausfälle durch die Saatgutqualität bedingt waren. Überlebende und schließlich überwinterte kräftige S_1 -Einzelpflanzen werden im kommenden Jahr gekreuzt (Ramschverfahren), um den Grundstein für eine neue Population zu legen.

Ausblick

Die Züchtungsarbeiten werden noch einige Jahre andauern. Bei den meisten Arten ist Potenzial zur Entwicklung einer verbesserten Sorte vorhanden. Ob künftig von den Landwirten Nachfrage nach solchen Sorten bestehen wird, hängt maßgeblich vom Gesamterfolg der Markteinführung von in Deutschland produzierten TCM-Drogen ab.

Danksagung

Bei allen, die durch ihre Mitarbeit und Unterstützung zu den Ergebnissen beigetragen haben, bedanken wir uns herzlich! Stellvertretend für viele andere gilt dieser Dank allen oben genannten Projektpartnern, sowie Herrn BAUMANN, Dr. DANIEL, Frau FUCHS, Herrn GASTL, Herrn HÖCK, Herrn GEISSENDÖRFER, Frau KÄRNER, Frau KLEIDORFER, Frau KOLLMANNBERGER, Dr. LEPSCHY, Herrn MAYR, Frau PAWLOWSKI, Frau REGENHARDT, Frau REUS, Herrn RINDER, Frau SCHANZE, Herrn SCHMIDMEIER, Frau SCHUMANN, Frau SCHWAIGER, Dr. SEEFELDER und Frau WAHL. Gedankt sei abschließend auch dem Bayerischen Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten und der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR, FKZ 22019707) für die großzügige finanzielle Förderung der Forschungsvorhaben, sowie den Firmen PhytoLab und Saatzucht Steinach.

Literatur

1. BAUMANN, A. und G. DANIEL, 2008: In vitro-Vermehrung von vier Arzneipflanzen der traditionellen chinesischen Medizin. SuB 1-2, III-4-7.
2. BOMME, U., 2000: Anbau und Züchtung von *Arnica montana*. Zeitschrift für Phytotherapie 21, 52.
3. BOMME, U., 2007: Integratives Forschungs- und Beratungsmanagement bei der Einführung ausgewählter chinesischer Heilpflanzen in die heimische Produktion. SuB 12, III-8-14.
4. BOMME, U. und G. DANIEL, 1994: Erste Untersuchungsergebnisse zur Auslesezüchtung bei *Arnica montana* L. Gartenbauwiss. 59 (2), 67-71.
5. BOMME, U., H. HEUBERGER und G. DANIEL, G. 2007: Abschlussbericht zur Fortführung des Forschungsvorhabens „Inkulturnahme und Etablierung neuer Heilpflanzenarten, die in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) eingesetzt werden. 151 S. Internetdokument, Abruf am 20.11.2008: http://www.lfl.bayern.de/ipz/heilpflanzen/16992/ab_min_chin_06_internet.pdf
6. HEUBERGER, H., U. BOMME und S. SEEFELDER, 2008: Erste Ergebnisse zur Befruchtungsbiologie von *Artemisia scoparia* Waldst. & Kit. Tagungsband 5. Fachtagung Arznei- und Gewürzpflanzen, 18.-21.2. 2008 in Bernburg. Landesanstalt für Landwirtschaft, Forsten und Gartenbau Sachsen-Anhalt, Bernburg: 18-19.
7. HEUBERGER, H. und U. BOMME, 2008: Erste züchterische Bearbeitung und Qualitätsbeurteilung ausgewählter chinesischer Heilpflanzen, die für den Anbau in Deutschland geeignet sind. Schlussbericht des Forschungsvorhabens. Internetdokument, Abruf am 20.11.2008: <http://www.lfl.bayern.de/ipz/heilpflanzen/16992/abschlussbericht.pdf>
8. HUMMELBERGER, J., U. BOMME und F. FRIEDL, 2006: Chinesische Arzneipflanzen - Anbau hierzulande garantiert Qualität. Deutsches Ärzteblatt 103, 21, A1442-A1443.
9. IHRIG, M., 2004: Qualitätsmängel bei TCM-Drogen. Pharmazeutische Zeitung 149, 3776-3783.

Keimfähigkeit, Triebkraft und Feldaufgang bei Hirse

Benno Voit^{1*}, Stephanie Wutz², Sebastian Kunz³, Albrecht Roller⁴,
Ewald Sticksel¹ und Berta Killermann¹

Einleitung

Der Energiepflanzenanbau hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Der Mais nimmt dabei eine dominierende Rolle ein. Zur Auflockerung dieser Energiepflanzen-Fruchtfolge ist Hirse eine interessante Alternative, weil sie ähnlich hohe Erträge pro ha liefert wie Mais. Hirse gehört zu den C4-Pflanzen und stellt damit hohe Ansprüche an Temperatur und Licht. Die Mindestkeimtemperatur liegt bei 12 °C und ist damit höher als bei Mais (10 °C). Der hohe Temperaturanspruch beeinflusst den Feldaufgang wesentlich. Es stellt sich daher die Frage, ob ein Prüfverfahren im Saatgutlabor entwickelt werden kann mit dem sich der Feldaufgang vorhersagen lässt.

In Deutschland ist Hirse nicht im Artenverzeichnis des Saatgutverkehrsgesetzes (SaatG) enthalten, d.h. für Hirsesaatgut gelten keine Mindestanforderungen für Keimfähigkeit, Reinheit, etc.. In der EU Richtlinie für Saatgut ist *Sorghum* enthalten, d.h. hier gibt es Mindestanforderungen (z.B. Keimfähigkeit: 80 %).

Material und Methoden

Keimfähigkeit

In einem Gemeinschaftsprojekt mit dem TFZ Straubing wurden im 1. Versuchsjahr 30 und im 2. Versuchsjahr 40 Hirseproben im Labor untersucht und parallel dazu im Feld angebaut. Die Keimprüfungen wurden nach den Internationalen Vorschriften zur Prüfung von Saatgut (ISTA Rules) durchgeführt, d.h. auf Filterpapier bei 25 °C und Wechsellicht. Im Anschluss daran konnten 3 Keimfähigkeitsgruppen gebildet werden:

- Gruppe I - Keimfähigkeit < 80 %
- Gruppe II - Keimfähigkeit ≥ 80 % und ≤ 90 %
- Gruppe III - Keimfähigkeit > 90 %

Triebkraft

Das Keimergebnis im standardisierten Laborversuch lässt keine Aussage über den zu erwartenden Feldaufgang zu, weil die Prüfung unter optimalen Temperaturbedingungen durchgeführt wird. Gerade bei Fruchtarten mit sehr hohem Temperaturanspruch ist eine weitere Prüfung im Labor unter Stressbedingungen, die den Feldaufgang beeinflussen

notwendig. Am besten dafür eignen sich Triebkraftprüfungen. Triebkraftprüfungen sind Keimprüfungen unter erschwerten Bedingungen, d.h. als Keimmedium wird Ackererde verwendet und die Keimtemperatur wird deutlich abgesenkt. Seit 30 Jahren wird die Triebkraftprüfung bei Mais erfolgreich durchgeführt und nachgefragt. Es ist daher naheliegend das Prüfungsverfahren bei Mais ebenfalls für Hirse anzuwenden. Das bedeutet, dass die Hirseproben eine Woche im Klimaschrank bei 10 °C (Stressphase) und im Anschluss in der Klimakammer bei 25 °C angezogen werden. In Vorversuchen hat sich eine weitere Prüfungsvariante bei 15 °C konstanter Temperatur herauskristallisiert.

Feldaufgang

Der Feldaufgang ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, z. B. Saatgutqualität, Saatbettvorbereitung, Saatechnik, Witterung usw.. Der Versuch wurde in Straubing, Niederbayern auf einem Lößlehm mit 72 Bodenpunkten durchgeführt. Die Jahresdurchschnittstemperatur beträgt 8,3 °C bei 673 mm Niederschlag. Der Versuch wurde als Blockanlage in dreifacher Wiederholung durchgeführt. Die Saatstärke betrug 25 Körner pro m². Pro Parzelle wurden 6 Reihen mit einer Länge von 7,2 m bei einem Reihenabstand von 50 cm ausgesät. Wegen Randeffekten wurde nur der Kernbereich der Parzellen ausgezählt, d.h. die inneren 4 Reihen.

Ergebnisse und Diskussion

Keimfähigkeit

Die Ergebnisse zeigen, dass die Qualität des verwendeten Saatgutes sehr unterschiedlich war (*Tabellen 1-3*). Insbesondere im 1. Versuchsjahr war der Anteil von Saatgutpartien mit mäßiger Keimqualität höher. Die Einteilung in 3 Gruppen wurde deshalb vorgenommen um zu sehen, ob sich die unterschiedlichen Saatgutqualitäten in der Triebkraftprüfung und beim Feldaufgang ähnlich verhalten.

Triebkraft

Die Triebkraftwerte liegen im Vergleich zu den Keimfähigkeitswerten bei beiden Prüfungsverfahren niedriger, wobei mit zunehmender Keimfähigkeit die Unterschiede zu den Triebkraftwerten geringer werden. Allerdings kommen in

¹ Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Vöttinger Straße 38, D-85354 FREISING

² Technische Universität München (TUM), FREISING-WEIHENSTEPHAN

³ Fachhochschule Weihenstephan (FH), FREISING und Agrocampus Ouest, Frankreich

⁴ Technologie- und Förderzentrum (TFZ), Schulgasse 18, D-94315 STRAUBING

* Ansprechpartner: Dipl.-Ing. Benno VOIT, benno.voit@lfl.bayern.de

Tabelle 1: Ergebnisse der Keimfähigkeit und Triebkraft des 1. und 2. Versuchsjahres. Gruppe I - Keimfähigkeit < 80 %

Proben-Nr.	1. Versuchsjahr			2. Versuchsjahr		
	Keimfähigkeit (%) 25 °C	Triebkraft (%) 10/25 °C	Triebkraft (%) ~15 °C	Keimfähigkeit (%) 25 °C	Triebkraft (%) 10/25 °C	Triebkraft (%) ~15 °C
1	10	8	4	65	42	32
2	36	35	29	67	61	46
3	44	42	36	68	52	51
4	44	14	11	75	69	72
5	66	65	61			
6	66	48	37			
7	73	72	62			
8	73	73	74			
9	76	71	54			
10	76	71	71			
11	78	66	69			
Mittelwert	58	51	46	69	56	50

Tabelle 2: Ergebnisse der Keimfähigkeit und Triebkraft des 1. und 2. Versuchsjahres. Gruppe II - Keimfähigkeit ≥ 80 ≤ 90 %

Proben-Nr.	1. Versuchsjahr			2. Versuchsjahr		
	Keimfähigkeit (%) 25 °C	Triebkraft (%) 10/25 °C	Triebkraft (%) ~15 °C	Keimfähigkeit (%) 25 °C	Triebkraft (%) 10/25 °C	Triebkraft (%) ~15 °C
1	81	80	78	81	58	56
2	83	59	75	84	62	65
3	86	84	87	86	87	75
4	89	89	90	88	89	78
5	89	92	88	88	70	75
6	90	75	78	88	79	69
7	90	91	93	89	87	80
8	90	81	77	90	88	90
9				90	87	83
10				90	90	90
11				90	90	89
12				90	91	88
13				90	86	78
Mittelwert	87	81	83	88	82	78

Tabelle 3: Ergebnisse der Keimfähigkeit und Triebkraft des 1. und 2. Versuchsjahres. Gruppe III - Keimfähigkeit > 90 %

Proben-Nr.	1. Versuchsjahr			2. Versuchsjahr		
	Keimfähigkeit (%) 25 °C	Triebkraft (%) 10/25 °C	Triebkraft (%) ~15 °C	Keimfähigkeit (%) 25 °C	Triebkraft (%) 10/25 °C	Triebkraft (%) ~15 °C
1	91	89	88	91	93	90
2	91	91	94	91	85	78
3	92	93	95	92	87	90
4	92	79	77	92	92	90
5	92	87	78	93	69	70
6	94	93	96	93	91	74
7	96	96	96	94	94	93
8	96	96	85	94	91	77
9	97	96	95	94	91	77
10	98	91	89	94	95	94
11				94	96	88
12				95	90	83
13				96	96	94
14				96	89	73
15				96	84	86
16				96	91	91
17				97	97	98
18				97	81	93
19				97	97	89
20				97	95	97
21				97	86	74
22				97	86	91
23				99	98	98
Mittelwert	94	91	89	95	90	86

Tabelle 4: Ergebnisse der Triebkraft und des Feldaufganges des 1. und 2. Versuchsjahres. Gruppe I - Keimfähigkeit < 80 %

Proben-Nr.	1. Versuchsjahr			2. Versuchsjahr		
	Triebkraft (%)		Feldaufgang (%)	Triebkraft (%)		Feldaufgang (%)
	10/25 °C	~15 °C		10/25 °C	~15 °C	
1	8	4	6	42	32	71
2	35	29	31	61	46	60
3	42	36	40	52	51	65
4	14	11	35	69	72	78
5	65	61	57			
6	48	37	49			
7	72	62	50			
8	73	74	37			
9	71	54	57			
10	71	71	54			
11	66	69	68			
Mittelwert	51	46	44	56	50	69

Tabelle 5: Ergebnisse der Triebkraft und des Feldaufganges des 1. und 2. Versuchsjahres. Gruppe II - Keimfähigkeit ≥ 80 ≤ 90 %

Proben-Nr.	1. Versuchsjahr			2. Versuchsjahr		
	Triebkraft (%)		Feldaufgang (%)	Triebkraft (%)		Feldaufgang (%)
	10/25 °C	~15 °C		10/25 °C	~15 °C	
1	80	78	63	58	56	68
2	59	75	40	62	65	79
3	84	87	65	87	75	87
4	92	88	64	89	78	83
5	75	78	70	70	75	70
6	91	93	52	79	69	77
7	81	77	65	87	80	89
8				88	90	81
9				87	83	77
10				90	90	87
11				90	89	79
12				91	88	92
13				86	78	81
Mittelwert	80	82	60	82	78	81

Tabelle 6: Ergebnisse der Triebkraft und des Feldaufganges des 1. und 2. Versuchsjahres. Gruppe III - Keimfähigkeit > 90 %

Proben-Nr.	1. Versuchsjahr			2. Versuchsjahr		
	Triebkraft (%)		Feldaufgang (%)	Triebkraft (%)		Feldaufgang (%)
	10/25 °C	~15 °C		10/25 °C	~15 °C	
1	89	88	42	93	90	83
2	91	94	41	85	78	83
3	93	95	48	87	90	80
4	79	77	65	92	90	81
5	87	78	75	69	70	76
6	93	96	76	91	74	80
7	96	96	60	94	93	93
8	96	85	77	91	77	90
9	96	95	62	91	77	83
10	91	89	82	95	94	82
11				96	88	81
12				90	83	75
13				96	94	88
14				89	73	85
15				84	86	86
16				91	91	88
17				97	98	95
18				81	93	88
19				97	89	94
20				95	97	92
21				86	74	83
22				86	91	84
23				98	98	84
Mittelwert	91	89	63	90	86	85

allen drei Gruppen Proben vor, die in der Triebkraft um mehr als 15 % unter der Keimfähigkeit liegen. Die Triebkraftvariante 15 °C konstant ist das strengere Prüfverfahren wie die Ergebnisse zeigen.

Feldaufgang

Beim Feldaufgang ist ein deutlicher Jahreseffekt festzustellen (Tabellen 4-6). Im 1. Versuchsjahr lag der Feldaufgang bei allen 3 Gruppen unter den Triebkraftwerten. Überraschend dabei war vor allem, dass bei der besseren Saatgutqualität (Gruppe II und III) der Feldaufgang zwischen 20 und 30 % unter den Werten der Triebkraft lag. Bei der schwächeren Saatgutqualität (Gruppe I) hat der Feldaufgang die Triebkraftwerte nur knapp unterschritten.

Im 2. Versuchsjahr zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen Triebkraft und Feldaufgang bei der besseren Saatgutqualität (Gruppe II und III). Bei der schwächeren Saatgutqualität (Gruppe I) übertraf der Feldaufgang die Triebkraftwerte erheblich. Warum der Feldaufgang zwischen den beiden Versuchsjahren so stark schwankte lässt sich mit der Bodentemperatur zur Saatzeit erklären (Tabelle 7).

Obwohl im 1. Versuchsjahr die Aussaat erst am 7. Juni erfolgte lag die Bodentemperatur nur bei 14 °C und damit nur knapp über der Mindestkeimtemperatur von 12 °C. Erst am 5. Tag nach der Saat erreichte die Bodentemperatur 20 °C. Im 2. Versuchsjahr lag die Bodentemperatur bereits zur Aussaat bei 20 °C, was zu einem deutlich höheren Feldaufgang führte.

Die Korrelation zwischen Feldaufgang und Triebkraft liegt im mittleren Bereich ($R^2 = 0,55-0,72$), wobei zwischen den beiden Triebkraftvarianten keine signifikanten Unterschiede bestehen.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Witterung zur und nach der Saat beeinflusst den Feldaufgang erheblich. Liegt die Bodentemperatur zur Aussaat und danach nur geringfügig über der Mindestkeimtemperatur ist der Feldaufgang z.T. deutlich unter den festgestellten Werten der Triebkraft. Im Gegensatz zu Mais kann sich

Tabelle 7: Bodentemperaturen zur Saat und zum Feldaufgang im 1. und 2. Versuchsjahr

1. Versuchsjahr		2. Versuchsjahr	
Datum	Temperatur (°C)	Datum	Temperatur (°C)
07.06.	14,0	27.05.	19,5
08.06.	15,1	28.05.	20,5
09.06.	16,2	29.05.	21,5
10.06.	16,7	30.05.	22,8
12.06.	17,5	31.05.	23,0
13.06.	20,0	01.06.	23,5
14.06.	21,4	02.06.	23,9
15.06.	22,3	03.06.	24,7
16.06.	23,3	04.06.	21,5
17.06.	24,2	05.06.	20,0
18.06.	22,3	06.06.	19,6
19.06.	22,3	07.06.	19,5
21.06.	24,3	08.06.	19,9
22.06.	24,5	09.06.	19,3
Summe	284,1	Summe	299,2

die Hirse bestocken und verfügt damit über ein Regulativ dünne Bestände wie z.B. im 1. Versuchsjahr bis zu einem bestimmten Grad auszugleichen. Zwischen den beiden getesteten Triebkraftvarianten (10/25 °C und 15 °C konstant) besteht ein geringer Unterschied. Vielleicht gelingt es mit Hilfe der Züchtung kältetolerantere Sorten zu schaffen und damit den Feldaufgang zu stabilisieren. Die Aufnahme der Hirse in das Artenverzeichnis des Saatgutverkehrsgesetzes ist anzustreben, damit zukünftig am Saatgutmarkt eine Mindestqualität für Hirsesaatgut angeboten werden muss.

Literatur

- FUCHS, H., 1997: Der Erd-Kalttest als Triebkraftprüfung; Möglichkeiten und Grenzen seines Einsatzes in der praktischen Saatgutprüfung. VDLUFA Schriftenreihe 46, 87-90.
- ISTA (International Seed Testing Association), 2008: International Rules for Seed Testing (Internationale Vorschriften für die Prüfung von Saatgut). Zürich, Schweiz.
- YU, J., M.R. TUINSTRAN, M.M. CLAASSEN, W.B. GORDON and M.D. WITT, 2002: Analysis of cold tolerance in sorghum under controlled environment conditions. Field Crops Research 86, 21-30.

Analyse und Integration wirksamer Mehлтаuresistenzen in Triticale

Kerstin Flath^{1*}, Bettina Klocke¹ und Matthias Herrmann²

Abstract

Increasing triticale acreages in Middle Europe stimulated the adaptation of powdery mildew populations to the race-specific resistances of most recommended varieties. As a consequence only a few varieties remained resistant after the first epidemics emerged in 2004 in Germany. Our findings indicate that powdery mildew of triticale most probably developed from wheat mildew. The triticale mildew population in Germany is highly diverse as shown by an analysis of 366 isolates from the main growing areas. In seedling tests with these 366 isolates only 'Grenado' was completely resistant among the currently registered triticale varieties. A screening of 826 preselected triticale breeding strains showed that 8% of this material has been completely resistant to four highly virulent isolates. In the field, 86% of these triticale strains were highly resistant after mildew inoculation indicating a combination of effective seedling and adult-plant resistance. Our aim is to characterise some of these resistances and to make them available for the breeders in future. The effects of known resistance genes from wheat could not be predicted when incorporated in primary triticale, i.e. resyntheses from wheat x rye. Obviously, the rye genome had a high impact on the resistance level of triticale. Indeed, a resistance gene from the triticale strain JKI.5015 could already been localized on rye chromosome 6RL by SSR markers. The high diversity of powdery mildew populations is a clue that newly detected race-specific resistances might be effective only for shorter periods. On the long run, breeders should combine them with effective adult-plant resistances to select for triticale varieties with durable resistance.

Keywords: powdery mildew - triticale - virulence analysis - resistance - breeding

Triticale galt lange Zeit als „Gesundfrucht“, deren Anbauwürdigkeit sich auch in der geringen Krankheitsanfälligkeit begründete. Im Jahr 2004 zeigte sich erstmals eine zunehmende Anfälligkeit einiger Triticalesorten gegenüber Echten Mehltau, *Blumeria graminis* DC. In den Folgejahren trat die Krankheit in vielen Regionen Deutschlands epidemisch auf. Vermutlich führte der zunehmende Anbauumfang von Triticale zur Anpassung der Mehltaupopulation an die rasenspezifischen Resistenzen aktueller Sorten.

Im Rahmen eines Forschungsprojektes soll neues, mehltairesistentes Ausgangsmaterial für die praktische Züchtung bereitgestellt werden, um die Widerstandsfähigkeit deutscher Triticalesorten zu erhöhen, Erträge langfristig zu sichern und die Wirtschaftlichkeit des Triticaleanbaus zu verbessern. Zur Abschätzung der Wirksamkeit und Dauerhaftigkeit dieser neuen Resistenzquellen wird eine Pathosystemanalyse durchgeführt, bei der sowohl die Pathogenpopulationen (Wirtsspezifität, Virulenzsituation, Komplexität, Diversität) als auch die Sortenresistenzen (Keimlings- und Adultpflanzenstadium, Übertragbarkeit von Mehltairesistenzen, Lokalisation von Resistenzgenen) untersucht werden.

Mit Infektionsversuchen wurde zunächst die **Wirtsspezifität** des Pathogens untersucht. Dazu sollte geklärt werden, ob der auf Triticale beobachtete Befall durch Weizen- oder Roggenmehltau verursacht wird, oder ob es sich hierbei um eine eigenständige Mehltauart handelt. Blattsegmenttests mit von Weizen, Roggen und Triticale isoliertem Mehltau aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands ergaben, dass von den getesteten 61 Triticalesorten nur einige wenige überhaupt von Weizen- und Roggenmehltau befallen wurden. Der Triticalemehltau konnte hingegen die Mehrzahl der Weizensorten, aber nur einige wenige Roggensorten befallen (*Tabelle 1*). Daraus lässt sich schließen, dass Triticalemehltau vermutlich aus Weizenmehltau entstanden ist, der sich speziell an diesen neuen Wirt angepasst hat.

Zur Analyse der **Virulenzsituation** des Triticalemehltaus in den wichtigsten deutschen Anbauregionen wurden 366 Einpustelisolat (EPI) aus mehltaubefallenen Blattproben hergestellt. Blattsegmenttests mit einem Differenzialsortiment aus 20 ausgewählten Triticalesorten konnten die untersuchten EPI insgesamt 136 unterschiedlichen Pathotypen zuordnen. Die **Komplexität** (=Anzahl der Virulenzfaktoren) der Isolate schwankte zwischen 6 und 18 von 20 möglichen

Tabelle 1: Reaktion unterschiedlicher Getreidearten auf von Weizen, Roggen und Triticale isoliertem Mehltau (+++ Mehrzahl, + wenige, – keine der getesteten Sorten befallen)

Getreideart	Mehltauisolate		
	Weizen (N = 20)	Roggen (N = 5)	Triticale (N = 31)
Weizen (N = 39)	+++	-	+++
Roggen (N = 6)	-	+++	+
Triticale (N = 61)	+	+	+++

Die Förderung des Forschungsvorhabens erfolgt aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung mit Unterstützung der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V.

¹ Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinst.für Kulturpflanzen, Inst. für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, D-14532 KLEINMACHNOW

² JKI, Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen, D-18190 GROSS-LÜSEWITZ

* Ansprechpartner: Dr. Kerstin FLATH, kerstin.flath@jki.bund.de

Tabelle 2: Blattsegmenttests primärer Triticale (mehltauresistenter Weizen x mehltauanfälliger Roggen) mit fünf Weizen- und fünf Triticalemehltauisolaten (+ = virulente, - = avirulente Reaktion der Isolate)

Weizen-Eltern (Resistenz)	Weizenmehltau-Isolate					Triticalemehltau-Isolate				
	1	24	42	55	116	6/4	8/2	41/2	11/1	26
<i>Triticum aestivum</i>:										
Rektor, Tukan (Pm5)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Götz (Pm8)	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Kristall (Pm5+8)	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Maris Huntsman (Pm2+6)	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Triticum durum</i>:										
D 8 (U*)	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D 9 (U*)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D 16 (U*)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Primäre Triticale										
Rektor x L301	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Tukan x L304	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Götz x L301	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Kristall x L304	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Maris Huntsman x L301	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D 8 x L301	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
D 9 x L301	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D 16 x L301	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

* Resistenz unbekannter Herkunft

Virulenzen. Die Mehrzahl der Isolate wies eine Komplexität von 15 auf. Als Maßzahl für die Verschiedenheit der getesteten EPI wurde ein Simpson-Index von $S=0,96$ ($S=0$ geringe Diversität, $S=1$ hohe Diversität) berechnet, der eine hohe **Diversität** der deutschen Triticalemehltaupopulation dokumentiert.

Um die **Sortenresistenzen** einschätzen zu können, wurde zu Beginn des Forschungsprojektes zunächst das Sortiment der im Jahr 2007 zugelassenen 23 Winter- und 6 Sommertriticalesorten mit insgesamt 366 Triticalemehltauisolaten aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands im **Keimlingsstadium** geprüft. Nur die Triticalesorte 'Grenado' erwies sich als resistent gegen alle getesteten Mehltauisolat. Im nächsten Schritt wurden insgesamt 826 vorselektierte Triticalelinien der am Projekt beteiligten Zuchtfirmen sowie des JKI mittels Blattsegmenttest mit vier hochvirulenten Mehltauisolaten im Primärblattstadium geprüft. Dabei erwiesen sich 8% der Linien als vollständig resistent. Diese potenziellen Resistenzquellen können zukünftig zur Erzeugung neuer, widerstandsfähiger Triticalesorten genutzt werden.

Zur Beurteilung der **Adultpflanzenresistenz** wurden im Jahr 2008 Feldprüfungen mit künstlicher Inokulation hochvirulenter Isolatagemische am JKI-Standort in Berlin-Dahlem in vierfacher Wiederholung in randomisierten Blockanlagen durchgeführt. Geprüft wurde das Zuchtmaterial, das im Blattsegmenttest vollständig resistent gegen zwei hochvirulente Isolate reagierte (173 Wintertriticale), die zur Zulassung beim Bundessortenamt angemeldeten Sorten (27 Wintertriticale) sowie die aktuell zugelassenen Triticalesorten (26 Winter- und Sommertriticale). Nach dreimaliger Bonitur konnten 86% der getesteten Triticalezuchtstämme, 63% der Wertprüfungssorten und 38% der zugelassenen Sorten als mehltauresistent eingestuft werden.

Für Untersuchungen zur **Übertragbarkeit von Mehltauresistenzen** aus Weizen in primäre Triticale konnte Material der Landessaatzuchtanstalt der Universität

Hohenheim genutzt werden. Hierbei handelt es sich um Kombinationen mehltauresistenter Weizen der Arten *Triticum aestivum* und *Triticum durum* mit den für Roggenmehltau anfälligen Roggenlinien L301 und L304 (Tabelle 2). Für Blattsegmenttests wurden fünf Weizen- und fünf Triticalemehltauisolate mit unterschiedlichen Virulenz-/Avirulenzgenkombinationen ausgewählt. Während die Weizenisolate auf den Weizen-Eltern sowohl virulente als auch avirulente Reaktionen hervorriefen, wurden die aus diesen Weizensorten entwickelten primären Triticale von keinem der Weizenisolate befallen. Im Gegensatz dazu konnten die Triticalemehltauisolate sowohl auf den Weizeneltern als auch auf den primären Triticale virulente Reaktionen hervorrufen, die Virulenz-/Avirulenzmuster beider waren jedoch nicht identisch. Diesen ersten Blattsegmenttests zufolge ist die Wirkung von Resistenzgenen aus Weizen in Triticale nicht vorhersagbar. Das Roggen-genom scheint einen wesentlichen Einfluss auf die Resistenzprägung zu haben. Diese Schlussfolgerungen werden derzeit durch zusätzliche Infektionstests verifiziert.

Für genetische Analysen und die chromosomale Lokalisation von Resistenzgenen wurden vom JKI in Groß Lüsewitz Kreuzungen zwischen den mehltauresistenten Triticalesorten 'Grenado', 'Agrano', 'Fargo' und 'Fidelio' sowie 10 Zuchtstämmen mit den mehltauanfälligen Triticalesorten 'Focus' und 'Trimester' durchgeführt. Die Prüfung der F1 weist auf dominante Resistenzgene in 'Agrano', Stamm JKI.59 und Stamm JKI.5015 hin. In den übrigen Sorten bzw. Zuchtstämmen wurden rezessive Vererbungsmodi gefunden. Für die monogen-dominant vererbte Resistenz aus Stamm JKI.5015 konnten gekoppelte roggen-spezifische molekulare Marker identifiziert werden, die eine Lokalisation des Resistenzgens auf Chromosom 6RL belegen.

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Der zunehmende Anbauumfang von Triticale führte in den letzten Jahren zur Anpassung der Mehltaupopulation

an die rassenspezifischen Resistenzen aktueller Sorten. Triticalemehltau, der sich wahrscheinlich aus Weizenmehltau entwickelt hat, weist eine hohe Diversität und Komplexität auf. Im aktuellen Triticale-Zuchtmaterial sind zahlreiche Resistenzquellen mit wirksamer Keim- und Adultpflanzenresistenz verfügbar, die im Rahmen eines Forschungsprojektes näher charakterisiert und für die praktische Züchtung bereitgestellt werden sollen. In primären Triticalen, d.h. Resynthesen aus Weizen und

Roggen, ist die Wirkung von Resistenzgenen aus Weizen nicht vorhersagbar. Das Roggengenom hat offensichtlich einen wesentlichen Einfluss auf die Resistenzausprägung. Die Resistenz des Triticale-Stamms JKI.5015 konnte bereits auf dem Roggenchromosom 6RL lokalisiert werden. Aufgrund der hohen Diversität der Triticalemehltaupopulationen sollten in der Züchtung nur Stämme mit wirksamen Adultpflanzenresistenzen eingesetzt werden, um möglichst dauerhafte Resistenzen zu erzeugen.

Verbesserung der Toleranz der Gerste gegenüber *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) durch Pyramidisierung von QTL

Christine Riedel^{1*}, A. Habekuss¹ und F. Ordon¹

Abstract

Barley yellow dwarf virus (BYDV) is an economically important pathogen of barley which may become even more important due to global warming. The opportunities to control this disease are up to now mainly limited to chemical measures against the aphid vectors because only the *Ryd2* gene has been incorporated into very few cultivars which gained no economic importance. Meanwhile additional loci conferring tolerance against BYDV were identified, like *Ryd3* and a QTL on chromosome 2H. The aim of the present study is to get information whether the level of tolerance against BYDV in barley can be improved by combining these loci. Therefore, DH-lines were genotyped by molecular markers for the presence of the susceptibility or the resistance encoding allele at respective loci (*Ryd2*, *Ryd3*, QTL on 2H) and were tested for their level of BYDV-tolerance after artificial inoculation with virus bearing aphids in field trials. The results of the first growing period indicate an additive effect of the tolerance alleles concerning some of the parameters analysed. The combination of *Ryd2* and *Ryd3* causes a significant reduction of the virus titre in the winter and spring barley DH-population. The DH-lines of the spring barley population carrying *Ryd2/Ryd3* also showed a significantly higher relative grain yield. In general the QTL of chromosome 2H had only a small effect on the level of tolerance.

Keywords: *Hordeum vulgare*, *Barley yellow dwarf virus*, tolerance, pyramiding, molecular marker

Zusammenfassung

Das Gerstengelverzweigungsvirus (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV) ist ein wirtschaftlich wichtiges Pathogen

im Getreideanbau, dessen Bedeutung infolge der prognostizierten Klimaerwärmung in den nächsten Jahrzehnten weiter zunehmen wird. Die Bekämpfungsmöglichkeiten sind auf die chemische Vektorbekämpfung sowie auf ackerbauliche Maßnahmen beschränkt.

In der Gerstenzüchtung wurde bisher das Resistenzgen *Ryd2* genutzt, jedoch wurden inzwischen weitere Toleranz bedingende Loci wie *Ryd3* und ein QTL auf Chromosome 2H identifiziert. Ziel der vorliegenden Arbeiten ist es Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob durch eine markergestützte Kombination dieser Loci das Toleranzniveau der Gerste gegenüber BYDV verbessert werden kann. Hierzu wurden DH-Linien-Populationen zunächst mit bekannten Markern für die entsprechenden Resistenzloci genotypisiert und anschließend nach künstlicher Inokulation mit BYDV-PAV deren Virusbefall sowie Ertragsparameter relativ zur nicht infizierten Kontrolle der gleichen DH-Linie bestimmt.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse zur Phänotypisierung dieser DH-Linien aus dem ersten Versuchsjahr lassen bezüglich einiger Parameter einen additiven Effekt der Toleranzallele erkennen. Die Kombination von *Ryd2* und *Ryd3* führte sowohl in den Wintergersten- als auch in den Sommergersten-DH-Linien zu einer signifikanten Verringerung des Virusgehaltes gegenüber den genotypisch anfälligen Linien (*ryd2/ryd3*) und solchen mit den entsprechenden einzelnen positiven Allelen. Ebenso konnte in DH-Linien der Sommergerstenkreuzung für diese Kombination (*Ryd2/Ryd3*) eine höhere Leistung im relativen Kornertrag pro Pflanze gegenüber den anderen Genotypen nachgewiesen werden. Der QTL auf Chromosom 2H zeigte allgemein nur eine geringe Toleranzwirkung.

Einleitung

Vor dem Hintergrund des Klimawandels ist aufgrund von milderem Herbst- sowie Wintertemperaturen mit einer sich zeitlich ausdehnenden Flugaktivität von Insekten zu rechnen. Dies wird auch Folgen für die Übertragung von insektenübertragbaren Viren wie z.B. für das durch Blattläuse übertragene *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) haben. Die in Mitteleuropa vorherrschenden relevanten Blattlausarten *Rhopalosiphum padi* und *Sitobion avenae* sind die Hauptvektoren für das hier dominierende BYDV-PAV (HABEKUSS et al. 2002). BYDV gehört zur Familie

der *Luteoviren* und befällt nahezu alle *Poaceae*, darunter auch viele wichtige Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Triticale und Mais (D'ARCY und DOMIER 2005). Es nimmt durch sein periodisch-epidemisches Auftreten vor allem in Wintergerste und Winterweizen und den daraus resultierenden erheblichen Ertragsverlusten mit bis zu 40% eine bedeutende Stellung im Getreideanbau ein (LISTER und RANIERI 1995, RIEDELL et al. 1999, OBERFORSTER 2002).

Je früher die Infektion in der Pflanzenentwicklung stattfindet, desto größer werden die zu erwartenden Schäden, so

¹ Julius Kühn-Institut - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Erwin-Baur-Straße 27, D-06484 QUEDLINBURG

* Ansprechpartner: Christine RIEDEL, christine.riedel@jki.bund.de

dass ein Schutz vor einer BYDV-Infektion insbesondere im Jungpflanzenstadium von Bedeutung ist. Eine effektive Bekämpfung des Virus ist zurzeit nur indirekt durch die Bekämpfung der Vektoren durch Insektizide möglich. Ebenso kann zur Reduzierung des Infektionsrisikos die Aussaat der Winterkultur in eine Zeit verschoben werden, in der der Blattlausflug bereits reduziert ist, d.h. in den Spätherbst (HUTH 2002). Diese Maßnahmen sind jedoch stark witterungsabhängig und häufig betriebswirtschaftlich nicht zu realisieren. Eine sichere und kostengünstigere Alternative zur Verringerung des Anbaurisikos sind resistente bzw. tolerante Sorten. Die Grundlage zur Züchtung solcher Sorten ist durch die Identifizierung von effektiven Toleranzgenen oder QTL gegeben. Bisher wurde das Resistenzgen *ryd1* (SUNESON 1955) identifiziert, welches aber wegen seiner nur sehr geringen Wirksamkeit in der Gerstenzüchtung nicht verwendet wurde. Des Weiteren wurde das unvollständig dominante Gen *Ryd2* (SCHALLER et al. 1964) auf Chromosom 3HL (COLLINS et al. 1996) lokalisiert. Dieses Gen bedingt eine Toleranz gegenüber BYDV-PAV und BYDV-MAV. Sein Toleranzeffekt ist jedoch stark abhängig vom genetischen Hintergrund und den Umweltbedingungen (SCHALLER 1984). In der äthiopischen Gerstenlinie 'L94' konnte ein zweites wirksames Gen, *Ryd3*, auf Chromosom 6H identifiziert werden, welches 75% der Varianz in der Symptomausprägung erklärt (NIKS et al. 2004). Ein QTL aus der Herkunft 'Post', auf den 19% der Variation im relativen Kornertrag/Pflanze zurückzuführen ist, wurde auf Chromosom 2HL lokalisiert (SCHEURER et al. 2001).

Bisher wurde zur Züchtung von toleranten Sorten lediglich *Ryd2* genutzt, wie z.B. in den Sorten 'Vixen' und 'Naturel'. Ziel der Arbeit ist es, im Hinblick auf eine weitere Verbesserung des Toleranzniveaus und als Ausgangspunkt für die Züchtung von BYDV-toleranten Sorten, die bekannten Toleranzallele (*Ryd2*, *Ryd3*, QTL 2H) sowohl in Winter- als auch in Sommergersten markergestützt zu kombinieren und deren Effekte auf den Virusbefall und die Ertragsleistung zu analysieren.

Material und Methoden

Zur Kombination der drei bekannten Toleranzallele in Gerste wurden doppelhaploide Linien der Kreuzungen 'RIL K4-56' (*Ryd3*; Sommergerste) x 'DH21-136' (*Ryd2* + QTL 2H; Wintergerste) und 'RIL K4-56' x 'Coracle' (*Ryd2*; Sommergerste) durch Mikrosporen- und Antherenkultur von der KWS-Lochow GmbH und der Saaten-Union Resistenzlabor GmbH hergestellt.

Die Extraktion der DNA zur Genotypisierung der vorhandenen 470 Wintergersten und 295 Sommergersten DH-Linien erfolgte durch eine Miniprep-Methode nach STEIN et al. (2002). Für den Nachweis von *Ryd2* wurde der Capsmarker YLP verwendet (FORD et al. 1998), dessen Produkt anschließend mit dem Restriktionsenzym *Hsp92II* geschnitten wurde. *Ryd3* wurde durch den Mikrosatellitenmarker HVM74 (NIKS et al. 2004) und der QTL auf Chromosom 2H mit HVCSG (SCHEURER et al. 2001) in einer vollautomatischen Kapillarelektrophorese (Beckman Coulter CEQ 8000) identifiziert.

Je zweihundert DH-Linien (inkl. Elternlinien) beider DH-Populationen wurden in der Vegetationsperiode 2007/2008 an vier Standorten in Deutschland (JKI, Quedlinburg; KWS-Lochow GmbH, Bernburg; Nordsaat, Gudow; Saatzucht Ackermann & Co, Irlbach) nach BYDV-Inokulation phänotypisiert. Nach der Aussaat im Gewächshaus von insgesamt 40 Körnern pro DH-Linie und pro Standort für die Varianten (Kontrolle/Infiziert) und zwei Wiederholungen wurden die Pflanzen der infizierten Variante im Einblattstadium zur Inokulation mit BYDV-PAV mit virustragenden Blattläusen der Art *Rhopalosiphum padi* (10 Aphiden/Pflanze) besetzt, welche nach einer Inokulationsdauer von fünf Tagen mit dem Insektizid Confidor abgetötet wurden. Zeitnah wurden die Pflanzen an den vier Versuchsorten ausgepflanzt, die Wintergerstenpopulation Mitte Oktober 2007, die Sommergersten Anfang April 2008.

Als erster Schritt der Phänotypisierung wurden bei den Wintergersten Mitte April und bei den Sommergersten sechs Wochen später, im Stadium zwischen Bestocken und Schossen, eine Symptombewertung (Boniturnote (BN) 1=ohne Symptome, BN 9=abgestorben) der infizierten Variante an den vier Versuchsorten durchgeführt. Zeitgleich wurden aus der infizierten Variante Blattproben für den DAS-ELISA zur Bestimmung des Virustiters in ausgewählten Linien aller auftretenden Allelkombinationen von bis zu zehn Einzelpflanzen je Linie von zwei Wiederholungen an zwei Standorten genommen (Wintergersten: 3 Linien je 8 Allelkombinationen in Quedlinburg und Gudow; Sommergersten: 6 Linien je 4 Allelkombinationen in Quedlinburg und Irlbach). Im weiteren Versuchsverlauf wurden das Ährenschieben sowie die Wuchshöhe erfasst. Zur Ernte wurden der Kornertrag sowie die Ertragstrukturparameter Ährenzahl und Tausendkorngewicht (TKG) bestimmt und für die Einzelpflanze berechnet. In der Verrechnung wurde jeweils die Leistung der BYDV-inokulierten Variante in Relation zur gesunden Kontrollvariante gesetzt. Die hier dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf den Standort Quedlinburg bei der Sommergerste, und die Standorte Quedlinburg, Bernburg und Gudow bei der Wintergerste.

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software SAS 9.1 durchgeführt. Die Daten - außer die Boniturnoten - wurden mittels ANOVA und anschließenden Tukey-Test ($\alpha=0,05$) analysiert. Die ordinalskalierten Boniturnoten wurden mit einer Bootstrap-Methode nach Neuhäuser und Jöckel (2006) und anschließendem T-Test ausgewertet.

Ergebnisse und Diskussion

Genotypisierung

Die sich aus den drei beziehungsweise zwei Toleranzloci ergebenden Allelkombinationen für beide DH-Populationen und die Aufspaltung der DH-Linien zeigt die Tabelle 1. Die Ergebnisse des Chi²-Tests zeigen für die Sommergersten-DH-Population (Chi²=3,04) im Gegensatz zu der Wintergersten-DH-Population (Chi²=74,61) eine Anpassung an die erwartete Aufspaltung.

Tabelle 1: Ergebnisse der Genotypisierung

<i>Ryd2/Ryd3</i> /QTL	rrr	rrs	rsr	srr	ssr	srs	rss	sss
Anzahl DH-Linien	93	49	43	92	52	76	37	28
<i>Ryd2/Ryd3</i>	rr		rs		sr		ss	
Anzahl DH-Linien	68		66		76		85	

r: Toleranzallel, s: Anfälligkeitsallel

Symptomausprägung und Virusgehalt

In der Wintergersten-DH-Population zeigte sich bei den genotypisch anfälligen Linien (sss) im Mittel die stärkste Symptomausprägung (BN 6) mit einer deutlichen Verzweigung der Pflanzen sowie stark reduzierter Triebzahl und Blattvergilbungen. Bei den DH-Linien der Genotypen mit dem QTL 2H (ssr) und *Ryd2* (rss) war mit mittleren BN von vier und drei ebenfalls noch eine Wuchsdepression und Vergilbungen zu sehen. Die DH-Linien der restlichen Genotypen, also alle mit *Ryd3* und die mit *Ryd2*+QTL 2H wiesen im Mittel nur Blattvergilbungen (BN 2) auf und zeigten statistisch keine signifikanten Unterschiede. In der Sommergersten-DH-Population ergab sich hinsichtlich wachsender Symptomausprägung für die vier Genotypen die Reihenfolge von *Ryd2*+*Ryd3*, *ryd2*+*Ryd3*, *Ryd2*+*ryd3* und *ryd2*+*ryd3*, wobei zwischen allen Genotypen statistisch gesicherte Unterschiede nachzuweisen waren.

Übereinstimmend in beiden Populationen war der Virusgehalt in den Pflanzen der Genotypen mit *Ryd2*+*Ryd3* gegenüber denen mit nur einem Toleranzallel deutlich reduziert (Abbildung 1), sodass diese Kombination als epidemiologisch vorteilhaft einzustufen ist. In den Sommergersten zeigte *Ryd3* als Einzelgen einen gesichert höheren Einfluss auf den Virustiter als *Ryd2*. In der Wintergersten DH-Population lässt sich tendenziell ähnliches erkennen, die Unterschiede zwischen den Genotypen sind hier jedoch nur teilweise signifikant. Der reduzierte Virusgehalt in den Genotypen mit allen Anfälligkeitsallelen ist vermutlich auf die starke Symptomexpression und die damit stark verringerte Vitalität der Pflanzen zurückzuführen. Aufgrund der Ergebnisse der Bonitur und des ELISA kann auf eine sehr gute Infektionsrate mit BYDV-PAV geschlossen werden, was eine entscheidende Voraussetzung für diese Arbeiten ist.

Ährenschieben und Wuchshöhe

Eine Verzögerung im Ährenschieben von durchschnittlich fünf Tagen ergab sich bei DH-Linien mit allen Anfälligkeitsallelen in der Wintergersten-Population am Standort Quedlinburg. Die Linien mit ausschließlich dem positiven Allel des QTL auf 2H oder am *Ryd2* Locus wiesen in dieser Population eine Verzögerung im Ährenschieben von durchschnittlich zwei bis drei Tagen auf. In der Sommergersten-DH-Population traten in der Allelkombination *ryd2/ryd3* sehr viele Pflanzen auf, bei denen die Ähren in den Blattscheiden stecken blieben und somit das Ährenschieben im Wesentlichen unterblieb.

In der relativen Wuchshöhe der Sommergersten zeigten die Genotypen mit *ryd2/ryd3* im Mittel eine deutlich stärkere Wuchsminderung (60%) als die Linien mit Toleranzallelen (95%). Gleiches ergab sich bei den Wintergersten am Standort Quedlinburg und Bernburg. Hier reagierten zusätzlich die Linien mit nur dem QTL auf 2H mit einer leichten Verzweigung der Pflanzen (86%).

Ertragsparameter

Im relativen Kornertrag/Pflanze zeigten die Linien der verschiedenen Genotypen der Sommergersten-DH-Population signifikante Unterschiede, wohingegen sich bei der Wintergersten-Population nur zwischen den Genotypen mit allen Anfälligkeitsallelen sowie denjenigen mit dem positiven Allel am QTL auf Chromosom 2H statistisch gesicherte Differenzen zu den restlichen Linien ergaben (Abbildung 2).

In der Sommergersten-Population zeigten Linien mit *Ryd2*+*Ryd3* eine erhöhte Leistung im relativen Kornertrag/Pflanze und tendenziell auch bei den Ertragsstrukturparametern relative Ährenzahl/Pflanze und relatives TKG.

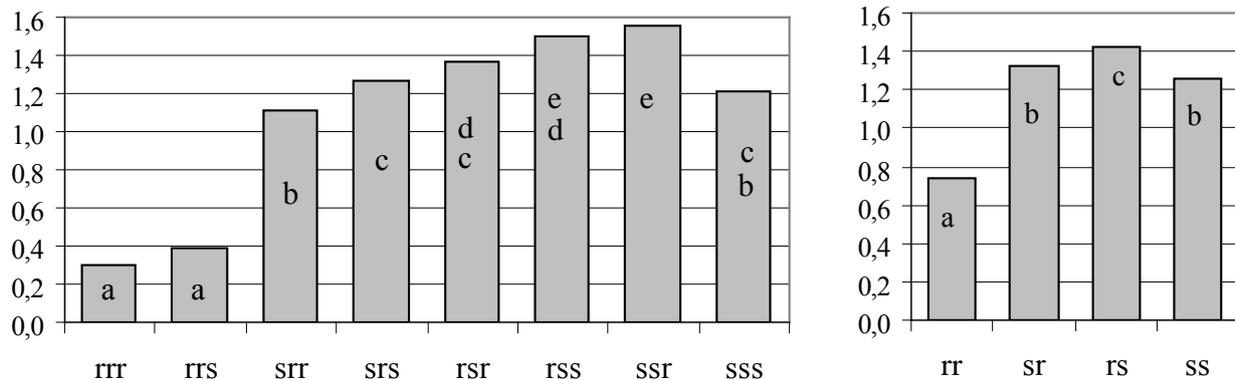


Abbildung 1: Mittlere ELISA-Extinktionen (405 nm) von Winter- (links) und Sommergersten-DH-Linien (rechts) mit verschiedenen Allelkombinationen. Unterschiedliche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede. Reihenfolge der Allele für Wintergerste: *Ryd2/Ryd3*/QTL, Sommergerste: *Ryd2/Ryd3*

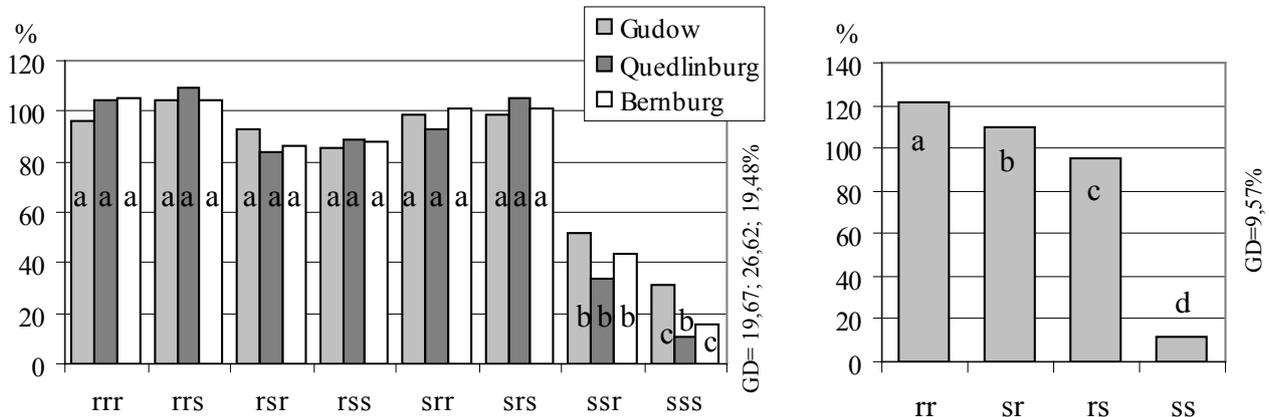


Abbildung 2: Relativer Kornertrag/Pflanze von Winter- (links) und Sommergersten-DH-Linien (rechts) mit verschiedenen Allelkombinationen. Unterschiedliche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede. Reihenfolge der Allele für Wintergerste: *Ryd2/Ryd3*/QTL, Sommergerste: *Ryd2/Ryd3*

Übereinstimmend in diesen Merkmalen hat *Ryd3* eine höhere Toleranzwirkung als *Ryd2*, die genotypisch anfälligen Linien reagierten mit einem starken Leistungsabfall im relativen Kornertrag/Pflanze und der relativen Ährenzahl/Pflanze. Tendenziell zeigte sich für die Wintergersten-DH-Linien ein ähnliches Ergebnis, wobei allerdings die relativ geringe Toleranzwirkung des QTL auf 2H noch berücksichtigt werden muss.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass durch die Kombination der Resistenzallele *Ryd2* und *Ryd3* die Widerstandsfähigkeit der Gerste gegenüber der Infektion mit BYDV-PAV deutlich verbessert wird. Auf Grund der signifikanten Reduktion im Virusgehalt sind Linien mit dieser Genkombination als quantitativ resistent zu beschreiben. Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnisse konnte dies in früheren Arbeiten für *Ryd2* und den QTL auf Chromosom 2H nicht nachgewiesen werden (SCHEURER et al. 2000). Die für die Genotypisierung der DH-Linien eingesetzten molekularen Marker haben ihre Eignung zum sicheren Nachweis der drei Resistenzallele in den verschiedenen Genotypen bestätigt und erlauben somit eine Pyramidisierung dieser Resistenzloci im praktischen Zuchtbetrieb (vgl. WERNER et al. 2006). Zur Verifizierung der Ergebnisse werden die Feldversuche in dieser Vegetationsperiode an den genannten Standorten wiederholt. Am Ende der Arbeiten werden somit phänotypisch und genotypisch charakterisierte DH-Linien beider Kreuzungskombinationen mit hoher BYDV-Toleranz bzw. -Resistenz stehen, die gemeinsam mit den entsprechenden Markern als Ausgangspunkt für eine züchterische Verbesserung der BYDV Toleranz dienen können.

Danksagung

Die dargestellten Arbeiten sind Teil eines Projektes, das im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), sowie durch die Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP) finanziert wird. Wir danken für die finanzielle Unterstützung. Unser weiterer Dank gilt der KWS-Lochow GmbH und der Saaten-Union Resistenzlabor GmbH für die

Erstellung der DH-Linien. Für die Durchführung der sehr arbeitsaufwendigen Feldversuche danken wir Herrn Dr. Claus EINFELDT (Dr. J. ACKERMANN und Co - Saat-zucht Irlbach), Herrn Dr. Eberhard LAUBACH (Nordsaat Saat-zuchtgesellschaft mbH) sowie Herrn Martin KOCH (KWS Lochow GmbH).

Literatur

- COLLINS, N.C., N.G. PALTRIDGE, C.M. FORD and R.H. SYMONS, 1996: The Yd2 gene for barley yellow dwarf virus resistance maps close to the centromere on the long arm of barley chromosome 3. *Theor. Appl. Genet.* 92, 858-864.
- D'ARCY, C.J. and L.L. DOMIER, 2005: Family *Luteoviridae*. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., EIGHTH DESSELBERGER, U., BALL, L.A. (eds): *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Report Internat. Committee Taxonomy of Viruses*. Elsevier, Acad. Press, 891-900.
- FORD, C.M., N.G. PALTRIDGE, J.P. RATHJEN, R.L. MORITZ, R.J. SIMPSON and R.H. SYMONS, 1998: Rapid and informative assays for Yd2, the barley yellow dwarf virus resistance gene, based on the nucleotide sequence of a closely linked gene. *Molecular Breeding* 4, 23-31.
- HABEKUSS, A., E. SCHLIEPHAKE, P. MATTHES, H. HARTLEB, S. MEHNER, M. GRÜNTZIG und E. FUCHS, 2002: Zum Auftreten des Gerstengelverzweigungsvirus und seiner Vektoren in Sachsen-Anhalt. Bericht über die 53. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatzuchtkaufleute Österreichs BAL Gumpenstein, 111-114.
- HUTH, W., 2002: Faktoren, welche die Ausbreitung der Verzweigungsviren im Getreide fördern und Maßnahmen, welche eine Schadensbegrenzung ermöglichen. Bericht über die 53. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatzuchtkaufleute Österreichs BAL Gumpenstein, 95-97.
- LISTER, M.R. and R. RANIERI, 1995: Distribution and Economic Importance of Barley Yellow Dwarf. In: D'ARCY, C.J., BURNETT, P.A. (eds.): *Barley Yellow Dwarf-40 Years of Progress*. APS Press, St. Paul, 29-53.
- NEUHÄUSER, M. and K.-H. JÖCKEL, 2006: A Bootstrap Test for the Analysis of Microarray Experiments with a Very Small Number of Replications. *Applied Bioinformatics* 5, 173-179.
- NIKS, R.E., A. HABEKUSS, B. BEKELE and F. ORDON, 2004: A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the barley yellow dwarf virus. *Theor. Appl. Genet.* 109, 1536-1543.

- OBERFORSTER, M., 2002: Viröse Gelbverzwergung bei Wintergetreide in Österreich - Sortenreaktion und Gegenstrategien. Bericht über die 53. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatzuchtkaufleute Österreichs BAL Gumpenstein. 99-106.
- RIEDEL, W.E., R.W. KIECKHEFER, S.D. HALEY, M.A.C. LANGHAM and P.D. EVENSON, 1999: Winter wheat responses to bird cherry-oat aphids and barley yellow dwarf virus infection. *Crop Sci.* 39, 158-163.
- SCHALLER, C.W., 1984: The genetics of resistance to barley yellow dwarf virus in barley. In: *Barley Yellow Dwarf, a Proceeding of the Workshop*. Burnett, P.A. (ed.), CIMMYT, Mexico, 93-99.
- SCHALLER, C.W., C.O. QUALSET and J.N. RUTGER, 1964: Inheritance and linkage of the Yd2 gene conditioning resistance to barley yellow dwarf virus disease in barley. *Crop Sci.* 4, 544-548.
- SCHEURER, K.S., W. FRIEDT, W. HUTH, R. WAUGH and F. ORDON, 2001: QTL analysis of tolerance to a German strain of BYDV-PAV in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 103, 1074-1083.
- SCHEURER, K.S., W. HUTH, W. FRIEDT and F. ORDON, 2000: First results on BYDV-tolerance in barley estimated in pot experiments. *J. Plant Diseases and Protection* 107, 427-432.
- SUNESON, C.A., 1955: Breeding for resistance to yellow dwarf virus in barley. *Agron. J.* 47, 283.
- STEIN, N., G. HERREN and B. KELLER, 2001: A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* 120, 254-356.
- WERNER, K., W. FRIEDT and F. ORDON, 2006: Localisation and combination of resistance genes against soil-borne viruses of barley (BaMMV, BaYMV) using doubled haploids and molecular markers. *Euphytica* 158, 323-329.

Einfluss von Genotyp und Umwelt auf den Blatt-Glucosinolatgehalt bei Raps

Stijn Cleemput^{1*} und Heiko C. Becker¹

Abstract

Glucosinolates are secondary plant metabolites, which are believed to have numerous functions in plant-pathogen interactions. In this study resynthesized rapeseed lines were examined for their variation in glucosinolate content in leaves and stems. Alkenyl glucosinolates are the most dominant glucosinolate group in the leaves (82%) followed by indolyl glucosinolates (17%) and phenylglucosinolates (1%). Only one resynthesized line shows a low alkenyl and high indolyl content in its leaves and stems, indicating a different gene action for indolyl and alkenyl synthesis in the green material. There was a significant correlation ($r^2=0.66$; $p=0.05$) between the content of glucosinolates in the stems and leaves. The glucosinolate content in the leaves varied considerably (0.16-4.64 $\mu\text{mol/g D.M.}$) with an average of 0.81 $\mu\text{mol/g D.M.}$ The average glucosinolate content in the stems was higher as in the leaves with a value of 1.29 $\mu\text{mol/g D.M.}$ The heritability of the total glucosinolates and the individual glucosinolate groups (alkenyl and indolyl) in the leaves and the stems was between 0.40 and 0.71.

Keywords: rapeseed, glucosinolate, alkenyl, resynthesized rapeseed

Einleitung

Ein zukünftiges Anwendungsgebiet von Raps könnte die Verwendung von Biomasse für die Biogasproduktion sein. Aufgrund des hohen Schwefelgehalts ist Raps dafür weniger geeignet. Glucosinolate sind schwefelhaltige Verbindungen und haben außerdem möglicherweise eine hemmende Wirkung auf Bakterien, welche für die Biogasproduktion verantwortlich sind. In dieser Arbeit wird die Vererbung in dem Grünmaterial der Rapspflanze untersucht.

Es ist zu vermuten, dass eine unterschiedliche genetische Kontrolle und Biosynthese der beiden Hauptgruppen, nämlich der Alkenyle und der Indol-Glucosinolate vorliegt (RÜCKER und RÖBBELEN 1994). Die Zusammenhänge zwischen den Alkenylen und Indolen werden in einem breiten genetischen Material untersucht.

Vor allem werden Resynthesen verwendet, die durch Artkreuzung zwischen Rübsen und Kohl hergestellt wurden. Es sollen die genotypische Varianz und der Einfluss der Umwelt in einem mehrortigen und mehrjährigen Feldversuch bestimmt werden.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial und Feldversuche

Das Ausgangsmaterial für die Feldversuche besteht aus 22 Resynthesen und einem Standard (Winterraps Express). Diese Population wurde 2008 in Einbeck und Göttingen angebaut. Die Pflanzen sind in Doppelreihen von 2 m Länge ausgesät worden. Im Frühjahr wurden Blatt- und Stängelproben geerntet. Aus Göttingen sind für zwei Jahre (2007 und 2008) Proben von einem Großteil der Population (14 Akzessionen) vorhanden, die ebenfalls im Frühjahr geerntet wurden. Für die Bestimmung der Heritabilität wird die Population um Kreuzungen erweitert, die 2008 an den gleichen beiden Standorten angebaut waren.

Extraktion und Bestimmung der Glucosinolate

Alle Proben wurden bei 55°C für 2 Tage getrocknet. Nach der Extraktion wurden die Glucosinolat-Gehalte mittels HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatografie) (THIES 1979) bestimmt. Neben dem Gesamtglucosinolatgehalt wurden auch die wichtigsten Glucosinolat-Typen der Alkenyl- (Progoitrin, Gluconapin, Glucobrassicinapin, Gluconapoleiferin) und Indol- (4-Hydroxyglucobrassicin, 4-Methoxyglucobrassicin, Neoglucobrassicin, Glucobrassicin) Gruppe bestimmt.

Ergebnisse

Glucosinolatmuster in den Blättern und Stängeln

Die Alkenyl- und Indol-Glucosinolate kommen sowohl in Stängeln als auch in Blättern vor. In den Blättern sind die Alkenylglucosinolate die dominante Glucosinolatgruppe (82%), gefolgt von Indol- (17%) und Phenyl-Glucosinolaten (1%). Auch in den Stängeln dominieren die Alkenyl-Glucosinolate für Blatt und Stängel von 23 Akzessionen im Mittel der beiden Standorte.

Die Korrelationen zwischen Alkenyl- und Indol-Glucosinolaten sind hoch signifikant ($r^2\text{Blatt}=0,57$ und $r^2\text{Stängel}=0,42$; $p=0,05$). Die Resynthese R53 zeigt als einzige Genotyp einen hohen Indol-Glucosinolatgehalt und einen niedrigen Alkenyl-Gehalt sowohl in den Blättern als auch in den Stängeln (*Abbildung 1*).

¹ Georg-August-Universität Göttingen, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Von-Siebold-Straße 8, D-37075 GÖTTINGEN

* Ansprechpartner: MSc. Stijn CLEEMPUT, scleemp@gwdg.de

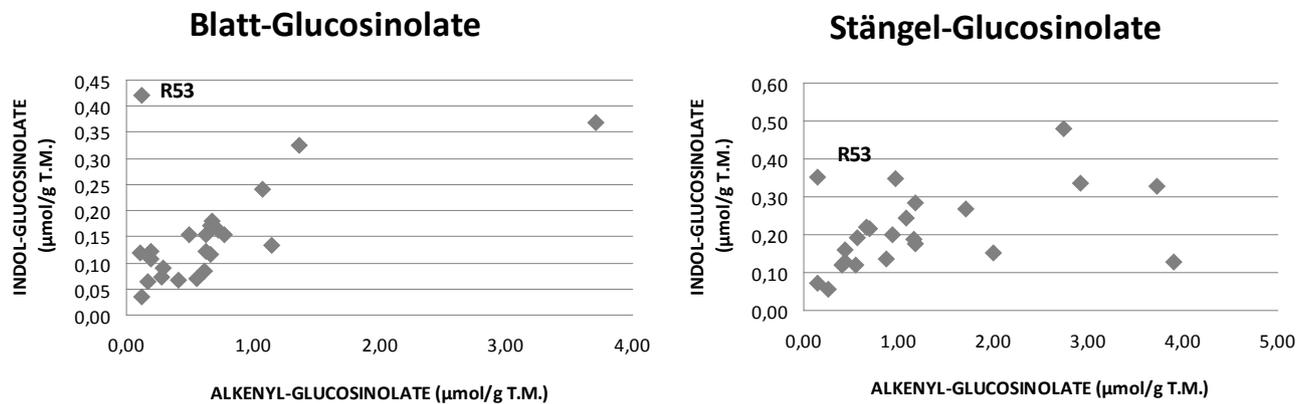


Abbildung 1: Zusammenhang zwischen Alkenyl- und Indol-Glucosinolate

Variation in Blatt und Stängel-Glucosinolaten im Resynthesierten Raps

Die Korrelation zwischen den Gesamt-Blatt- und Stängel-Glucosinolaten ist signifikant ($r^2=0,66$, $p=0,05$). *Abbildung 2* zeigt die Glucosinolatgehalte für die unterschiedlichen Resynthesen, wobei H4 in den Blättern den niedrigsten Wert (0,16 µmol/g TM) und S3 den höchsten Wert (4,64 µmol/g TM) aufweisen. Der Mittelwert aller Genotypen im Blatt-Glucosinolatgehalt ist 0,81 µmol/g TM und im Stängel-Glucosinolatgehalt 1,29 µmol/g TM.

Abbildung 3 zeigt die Werte für 14 Resynthesen in drei Umwelten. Der Mittelwert für Göttingen ist 1,14 µmol/g TM für das Anbaujahr 2007 und 1,37 µmol/g TM für 2008. Der Mittelwert für Einbeck in 2008 beträgt 0,93 µmol/g TM. Damit zeigt der Standort auf die Blatt-Glucosinolate einen höheren Einfluss als das Jahr. In allen drei Umwelten hat S3 den höchsten Wert.

Heritabilität

Die Heritabilität für Glucosinolate in Blättern und Stängeln ist im Allgemeinen relativ hoch (*Tabelle 1*). Die Variation für den Glucosinolatgehalt sowohl in den Blättern als auch in den Stängeln ist also stark genetisch bedingt. Die Heritabilität ist für die beiden Hauptgruppen (Alkenyle und Indole) vergleichbar hoch. Der Umwelteinfluss scheint für die Stängel-Indole im Vergleich zu den Blatt-Indolen eine geringere Rolle zu spielen.

Diskussion

In den Blättern und Stängeln von resynthetisiertem Raps sind Progoitrin, Gluconapin und Glucobrassicinapin die dominanten Glucosinolat-Typen. Dies bestätigt ähnliche Untersuchungen von BECKMANN et al. (2007). Im Allgemeinen sind Alkenyl- und Indol-Glucosinolate hoch korreliert, wobei die Resynthese R53 eine bemerkenswerte Ausnahme ist.

Obwohl signifikant korreliert, übersteigt der Stängelglucosinolatgehalt den Blattglucosinolatgehalt. Dies ist vermutlich auf unterschiedliche Transportwege der Glucosinolate in der Pflanze zurückzuführen (BENNERT 1992). Untersucht wurde sowohl der Standorteinfluss als auch der Jahreseinfluss. Der Einfluss der Jahre war nur gering, dies müsste aber durch Untersuchungen in weiteren Jahren bestätigt werden. Die Heritabilität für die Glucosinolate in den Blättern und Stängeln ist relativ hoch, wenn man berücksichtigt, dass für deren Berechnung ein Versuch ohne Wiederholung an einem Standort in zwei Jahren verwendet wurde.

Glucosinolate haben eine Bedeutung für den Schutz gegen Krankheiten (MITHEN 2001), Indol-Glucosinolate können außerdem eine physiologische Funktion haben (BENNERT 1992), die fungizide Wirkung der Alkenyl-Glucosinolaten ist dagegen nicht immer eindeutig (GIAMOUSTARIS and MITHEN 1997). Noch weniger bekannt ist über eine mögliche bakterizide Wirkung der Glucosinolate z.B. bei der Biogaserzeugung. Dazu sind weiterführende Untersuchungen vorgesehen.

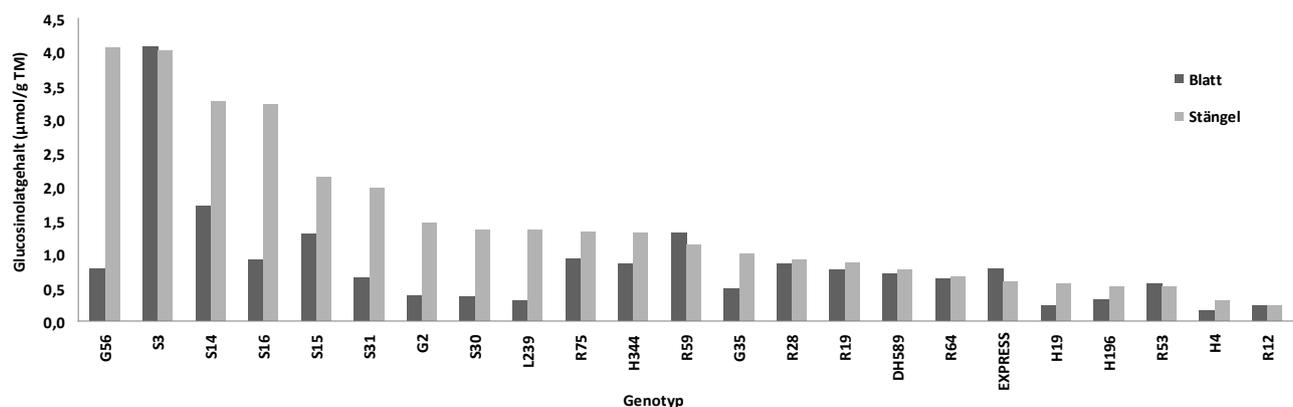


Abbildung 2: Genotypische Variation für Blatt und Stängel-Glucosinolate, Mittel über 2 Standorte

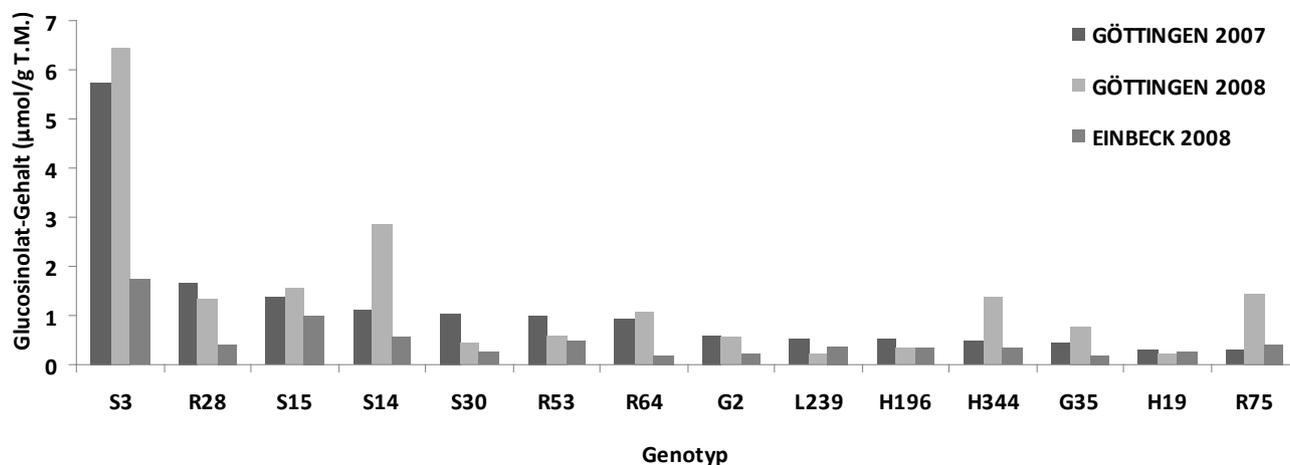


Abbildung 3: Genotypische Unterschiede für Blatt-Glucosinolate in drei unterschiedlichen Umwelten

Tabelle 1: Heritabilität für die Glucosinolate und Glucosinolatgruppen in den Blättern und Stängeln

Pflanzenteil	N	Progoitrin	Alkenyl-Glucosinolate	Indol-Glucosinolate	totale Glucosinolate
Stängel	58	0,54	0,50	0,71	0,54
Blätter	62	0,54	0,53	0,56	0,40

Danksagung

Unser Dank gilt der DBU (Deutsche Bundesstiftung Umwelt) für die finanzielle Unterstützung und der KWS Saat AG für die Betreuung der Feldversuche in Einbeck.

Literatur

- BECKMANN, K., C. MÖLLERS, H.C. BECKER and F.J. KOPISCH-OBUCH, 2007: Genetic variation of glucosinolates in young leaves of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) Proceedings 12th International Rapeseed Congress, Wuhan, China, 258-260.
- BENNERT, H., 1992: Variation des Glucosinolatgehaltes und -Musters bei Raps (*Brassica napus* L.) in Abhängigkeit von Genotyp

und Pflanzenentwicklung. Dissertation, Freie Universität Berlin, Deutschland.

- GIAMOUSTARIS, A. and R. MITHEN, 1997: Glucosinolates and disease resistance in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). Plant Pathology 46: 271-275.
- MITHEN, R., 2001: Glucosinolates - biochemistry, genetics and biological activity. Plant Growth Regulation 34: 91-103.
- RÜCKER, B. and G. RÖBBELEN 1994: Inheritance of total and individual glucosinolate contents in seeds of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). Z. Pflanzenzüchtg. 113: 206-216.
- THIES, W., 1979: Quantitative analysis of glucosinolates after their enzymatic desulfatation on ion exchange columns. Proceedings of the 5th International Rapeseed Conference, Malmö Sweden, 136-139.

Raps als Modell zur Untersuchung der „fixierten Heterosis“ bei allopolyploiden Pflanzen

Franziska Wespel^{1*} und Heiko C. Becker¹

Zusammenfassung

Allopolyploidie spielte bei der Evolution der Pflanzen eine große Rolle. Die hohe Leistung allopolyploider Pflanzen kann unter anderem mit günstigen Wechselwirkungen zwischen den homeologen Genen der Elternlinien („fixierte Heterosis“) erklärt werden. Durch eine vergleichende QTL-Analyse zwischen resynthetisiertem Raps (*Brassica napus*) und seinen diploiden Elternlinien (*Brassica rapa* und *Brassica oleracea*) sollen Loci detektiert werden, die zur Ausprägung von fixierter Heterosis beitragen. Hierzu wurden drei segregierende RIL-Populationen entwickelt und auf ihre Biomasseleistung hin untersucht. Für die Markeranalyse werden AFLP-Marker sowie Mikrosatelliten verwendet, um einen Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen zu ermöglichen.

Abstract

We propose an experimental approach to quantify “fixed heterosis” in resynthesized *Brassica napus* and to detect loci contributing to “fixed heterosis” via comparative QTL mapping in *B. napus* and its parental species *B. rapa* and *B. oleracea*. To identify the contribution of individual genes to the fixed heterosis by QTL mapping, three segregating RIL populations were developed and analyzed for early biomass. The marker analysis will be performed with AFLPs and SSR markers allowing a comparison with results of groups working with *Brassica* and *Arabidopsis*.

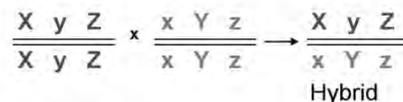
Key words: fixed heterosis, allopolyploidy, QTL-analysis, *Brassica*, early biomass

Die spontane Hybridisierung verwandter Arten durch Kombination ihrer Genome (Allopolyploidie) spielte bei der Evolution der Pflanzen eine wichtige Rolle. Trotzdem sind die Mechanismen für den Erfolg der Allopolyploiden noch kaum verstanden (OSBORN et al. 2003, SOLTIS and SOLTIS 2000). Ein Grund für ihren Erfolg könnten die positiven Interaktionen zwischen den homologen Chromosomen sein. Positive Interaktionen zwischen den homeologen Loci sollten auch bei homozygoten Genotypen zu einer Mehrleistung der Allopolyploiden im Vergleich zu ihren Elternlinien führen (Abbildung 1). Da diese epistatischen Interaktionen im Gegensatz zur klassischen Heterosis nicht in der F1 aufspalten, werden sie als „fixierte Heterosis“ bezeichnet (ABEL et al. 2005). *Brassica napus* (mit seiner Genomzusammensetzung AAC) ist ein optimales Modellsystem, um fixierte Heterosis mit Hilfe eines QTL-Mappings genauer zu untersuchen, da hier neue Resynthesen einfach aus den diploiden Elternarten *B. rapa* (AA) und *B. oleracea* (CC) hergestellt werden können.

Für die Untersuchungen wurden eine *Brassica rapa* var. *trilocularis* Linie (RO18 = A₁A₁) vom John Innes Center, eine *Brassica rapa* var. *oleifera* Linie (6748-1430 = A₂A₂) von Agri Food Canada und zwei *Brassica oleracea* var. *albojlabra* Linien (A12 = C₂C₃ and S2C3-4-1 = C₄C₄) (John Innes Center und Crucifer Genet. Cooper.) verwendet. Die Linien sind entweder Doppelhaploide oder Inzuchtlinien. Die vier Linien wurden anhand der fixierten Elternmittelheterosis von 49,9% und 70,5% ausgewählt, die die daraus resynthetisierten Genotypen A₁A₁C₃C₃ and A₂A₂C₄C₄ aufzeigten.

So wurden, um den Beitrag einzelner Gene zur fixierten Heterosis mit QTL-Mapping zu messen, drei segregierende

A: Klassische Heterosis



B: Fixierte Heterosis

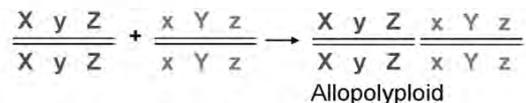


Abbildung 1: Vergleich von klassischer und fixierter Heterosis

Populationen aus rekombinanten Inzuchtlinien (RIL) in F5/F6 erstellt. Zwei in den diploiden Elternlinien, die je für das A- und C-Genom aufspalten (A₁A₂, C₃C₄) und eine Dritte, die aus der korrespondierenden Allopolyploiden (A₁A₂C₃C₄) erstellt wurde. Diese spaltet für Loci in beiden Genomen auf. In den diploiden Populationen wurden 150 RIL genotypisiert und phänotypisiert und in der allopolyploiden waren es 222 RIL, um eine vergleichbare Detektionsstärke zu gewährleisten.

Für die phänotypischen Daten der QTL-Analyse wurde die frühe Biomasse der RIL bestimmt. Das Merkmal frühe Biomasse wurde gewählt, da aufgrund der hohen Inzuchtgeneration der getesteten Linien Schwierigkeiten bei Blühverhalten, Fertilität und Saatgutentwicklung erwartet wurden. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus. Jeweils acht Pflanzen je RIL wurden in vier Wiederholungen in einer unvollständigen Gitteranlage, die mit Plabplan (UTZ 1994) erstellt wurde, getestet. Die Ernte der oberirdischen Biomasse erfolgte

¹ Georg-August-Universität, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Von-Siebold-Straße 8, D-37075 GÖTTINGEN

* Ansprechpartner: Dipl. Agr. Biol. Franziska WESPEL, fwespel@gwdg.de

Tabelle 1: Adjustierte Mittelwerte (Mean), Grenzwerte bei 5% (LSD), Extremwerte (Min, Max) und Ergebnisse der Varianzanalyse für die bestimmten Merkmale Frischmasse (FM), Trockenmasse (TM) und Wachstumsrate (FM 2-FM 1, TM 2-TM 1) in den drei RIL Populationen

Merkmale	Mean	LSD	Min	Max	Var. komp.	F-Wert
A₁A₂						
FM 1	1.04	0.39	0.31	1.90	0.0487	3.25 **
TM 1	0.07	0.03	0.02	0.13	0.0002	2.95 **
FM 2	2.30	0.67	0.87	3.68	0.2452	5.10 **
TM 2	0.17	0.05	0.05	0.26	0.0012	4.82 **
FM 2 - FM 1	1.26	0.71	0.48	2.16	0.0853	2.21 **
TM 2 - TM 1	0.09	0.05	0.03	0.17	0.0005	2.30 **
C₃C₄						
FM 1	0.84	0.23	0.40	1.26	0.0179	3.52 **
TM 1	0.06	0.02	0.03	0.09	0.0001	2.83 **
FM 2	1.69	0.41	1.05	2.48	0.0596	3.79 **
TM 2	0.13	0.03	0.08	0.18	0.0004	3.52 **
FM 2 - FM 1	0.85	0.42	0.34	1.60	0.0129	1.57 **
TM 2 - TM 1	0.07	0.03	0.02	0.13	0.0001	1.54 ns
A₁A₂C₃C₄						
FM 1	1.40	0.57	0.19	2.44	0.1313	4.10 **
TM 1	0.09	0.04	0.02	0.18	0.0006	3.86 **
FM 2	2.96	1.10	0.87	5.39	0.4143	3.62 **
TM 2	0.20	0.08	0.06	0.38	0.0023	3.79 **
FM 2 - FM 1	1.57	1.13	0.22	3.46	0.0713	1.43 *
TM 2 - TM 1	0.11	0.10	0.00	0.49	0.0005	1.41 *

** signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01, * signifikant bei 0,05 und + signifikant bei 0,10

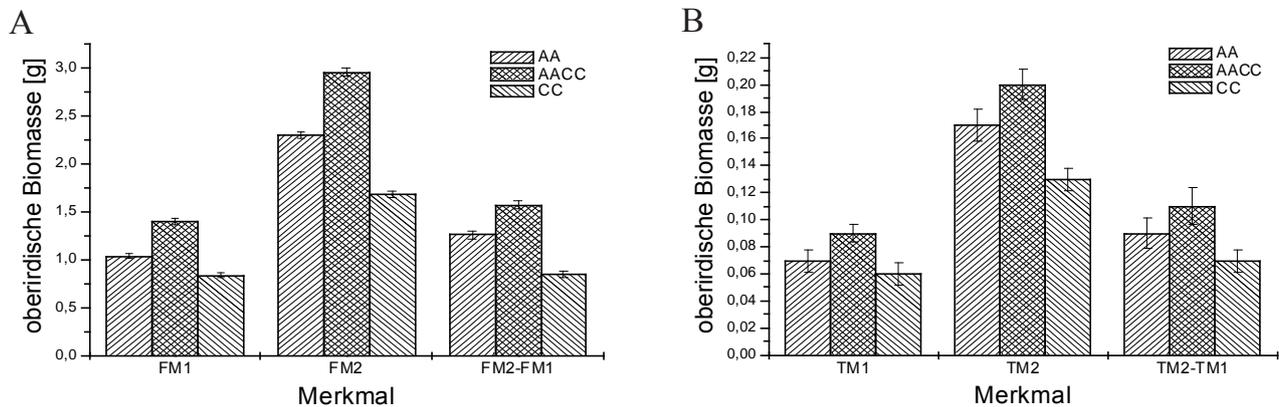


Abbildung 2: Vergleich der adjustierten Mittelwerte für Frischmasse (A) und Trockenmasse (B) in den RIL-Populationen A1A2, A1A2C3C4 und C3C4; (Konfidenzintervall 95%)

18 und 22 Tage nach der Aussaat. Als Merkmale wurde die Frischmasse (FM), Trockenmasse (TM) zu beiden Erntezeitpunkten erfasst und die absolute Wachstumsrate (FM2-FM1, TM2-TM1) zwischen beiden Ernteterminen bestimmt. Die Varianzanalyse und Korrelationen wurden mit Plabstat (UTZ 2004) berechnet.

Zwischen den verschiedenen Genotypen der drei untersuchten Populationen wurde bei allen Merkmalen bis auf TM1-TM2 in C₃C₄ ein signifikanter Unterschied beobachtet (Tabelle 1).

Vergleicht man das Mittel der A₁A₂ und C₃C₄ Linien mit dem Mittel der A₁A₂C₃C₄ Linien, so wiesen letztere eine größere Biomasse für die Frisch- und Trockenmasse an beiden Erntezeitpunkten auf (Abbildung 2).

In allen drei RIL-Populationen waren Frisch- und Trockenmasse beider Erntezeitpunkte hochkorreliert. Ebenso sind die Ergebnisse der beiden Erntezeitpunkte mit 0,72 bis 0,81 miteinander korreliert (Tabelle 2).

Der Trockensubstanzgehalt betrug zum ersten Erntezeitpunkt 6,7% bei A₁A₂, 7,1% bei C₃C₄ und 7,1% bei A₁A₂C₃C₄. Zum zweiten Erntezeitpunkt war der Trockensubstanzgehalt bei A₁A₂ 7,4%, bei C₃C₄ 7,7% und 7,1% bei A₁A₂C₃C₄.

In unserem Projekt wurden für die Biomasseversuche und den Vergleich mit den Resynthesen diploide Linien statt autotetraploider verwendet, da die Autotetraploiden weniger fertil und wüchsig waren als die Diploiden. So haben ABEL und BECKER (2007) beobachtet, dass tetraploide Linien einen um 2-64% geringeren Biomasse aufwiesen als die korrespondierenden diploiden Linien. Dies könnte auf Meiosestörungen hindeuten und Schwierigkeiten bei der Entwicklung der RILs und auch bei der Markeranalyse und Interpretation der Ergebnisse verursachen.

Des Weiteren hatten die Diploiden und Allopolyploiden einen ähnlichen Trockensubstanzgehalt, was mit den Beob-

Tabelle 2: Korrelationen zwischen Trockenmasse und Frischmasse

Variable	FM 1	TM 1	FM 2
TM 1	0.95 **		
FM 2	0.79 **	0.73 **	
TM 2	0.73 **	0.72 **	0.96 **
C3C4			
TM 1	0.95 **		
FM 2	0.78 **	0.72 **	
TM 2	0.73 **	0.72 **	0.95 **
A1A2C3C4			
TM 1	0.97 **		
FM 2	0.81 **	0.78 **	
TM 2	0.80 **	0.80 **	0.97 **

** Signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01, * signifikant bei 0,05 und + signifikant bei 0,10

achtungen von ABEL und BECKER (2007) übereinstimmt, die ebenfalls keinen signifikanten Effekt des Ploidiegrades auf den Trockensubstratgehalt feststellen konnten.

In den Biomasseversuchen wiesen die Allopolyploiden eine signifikant höhere Biomasse auf als die Diploiden (Abbildung 2), somit ist das von uns ausgewählte Material geeignet, um QTL für fixierte Heterosis zu identifizieren. Für eine QTL-Analyse ist es außerdem notwendig, dass es Unterschiede zwischen den RILs einer Mappingpopulation gibt. So war hier die Variation innerhalb einer Population hochsignifikant und die Linien der A₁A₂ Population zeigten eine höhere Variabilität als die RIL der C₃C₄ Population. Dies stimmt mit der von ABEL et al. (2005) bestimmten genetischen Distanz nach Jaccard von 0,741 für A₁ und A₂ und von 0,313 für C₃ und C₄ überein.

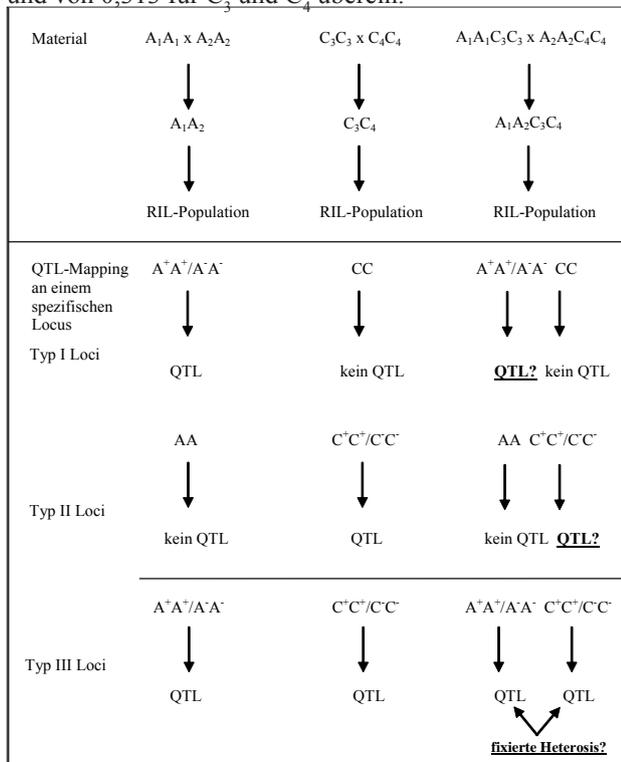


Abbildung 3: Prinzipien des QTL-Mappings um fixierte Heterosis zu analysieren (Erläuterungen siehe Text).

Für die Markeranalysen wurden AFLP und SSR Marker verwendet. AFLPs sind eine günstige und schnelle Methode, um DNA-Polymorphismen zu detektieren und eine Frameworkmap zu erstellen (VOS et al. 1995). Die zusätzlich verwendeten SSR-Marker sind möglichst gleichmäßig über das Genom verteilt, um ein Alignment mit anderen Kopplungskarten zu ermöglichen und die Chromosomen zuordnen zu können. So wurden schon in früheren Studien (SAAL et al. 2001) Mikrosatellitenmarker in *B. oleracea*, wie auch in *B. rapa* und *B. napus*, angewandt, um erfolgreich die homeologen Beziehungen aufzuzeigen. Eine Kopplungskarte, basierend auf molekularen Markern, die es erlauben, zwischen homologen und homeologen Regionen zu unterscheiden, ist notwendig für eine vergleichende Analyse in *Brassica*-Arten.

In den Populationen von A₁A₂ und C₃C₄ wurden bereits QTL für Biomasse detektiert (Daten werden hier nicht gezeigt) und wir hoffen, dieselben QTL in der A₁A₂C₃C₄ Population zu finden. Für die beobachteten QTL können drei verschiedene Fälle klassifiziert werden (Abbildung 3): QTL, die im A-Genom detektiert werden, aber nicht an der korrespondierenden Position im C-Genom (I). QTL, die im C-Genom detektiert werden, aber nicht an der entsprechenden Position des A-Genoms (II) und QTL die sowohl im A-Genom als auch im C-Genom an den korrespondierenden Positionen bestimmt werden. Das Prinzip des QTL-Mappings ist es, jene QTL, die jeweils im A- und C-Genom identifiziert wurden, mit denselben QTL in der allopolyploiden Situation zu vergleichen. Unter der Annahme von fixierter Heterosis sollten sich die Effekte bei der Allopolyploiden unterscheiden. Zumindest einige der QTL, die nur im A-Genom (I) detektiert wurden, sollten in der Allopolyploiden nicht mehr nachweisbar sein, da das C-Genom ein positives Allel mit maskierendem Effekt auf das andere Genom haben könnte. Entsprechend sollten einige der QTL, die im C-Genom (II) detektiert werden, verschwinden, da sie von positiven Allelen im A-Genom maskiert werden. QTL, die jedoch in beiden Genomen (III) detektiert werden, sollten nicht verschwinden, aber es sollte epistatische Effekte zwischen ihnen geben, da (A⁺A⁺C⁻C⁻ + A⁻A⁻C⁺C⁺) einen größeren Effekt haben sollte als (A⁺A⁺C⁺C⁺ + A⁻A⁻C⁻C⁻) (Tabelle 3). Da in unserem Versuch nur homozygote Linien verwendet wurden, können nur additive Effekte und additive x additive Epistasie auftreten. In der Annahme, dass nur additive Geneffekte (keine Epistasie/fixierte Heterosis) auftreten, sollten alle im A- und C-Genom detektierten QTL dieselben Effekte in der allopolyploiden Situation aufweisen. Sollte es jedoch Unterschiede geben, so ist dies ein Hinweis auf fixierte Heterosis. Diese Annahmen sind nur gültig, wenn der Effekt eines negativen Allels in einem Genom vollständig durch

Tabelle 3: Mögliche Allelkombinationen in der Allopolyploiden an zwei homeologen Loci und das erwartete Auftreten von fixierter Heterosis

Genotyp	fixierte Heterosis
A ⁻ A ⁺ C ⁺ C ⁺	nein
A ⁻ A ⁻ C ⁻ C ⁻	nein
A ⁺ A ⁺ C ⁻ C ⁻	ja
A ⁻ A ⁻ C ⁺ C ⁺	ja

ein positives Allel im anderen kompensiert werden kann, ansonsten wird der QTL nicht vollständig verschwinden, sondern nur einen geringeren Effekt haben.

Mit diesem Ansatz wird es möglich sein, zumindest einige QTL für fixierte Heterosis zu identifizieren, die dann in weiteren Forschungsvorhaben detaillierter untersucht werden können. Durch die Verwendung der SSR-Marker wird außerdem ermöglicht, unsere Ergebnisse mit den Ergebnissen von QTL-Mappings in anderen Arbeitsgruppen zu vergleichen, die mit *Brassica* oder *Arabidopsis* arbeiten. Dies alles wird dazu beitragen, den Einfluss der fixierten Heterosis auf den Erfolg von Allopolyploiden besser zu verstehen.

Danksagung

Stefan ABEL, Roland STÜBE, Torben SCHULZ-STREECK.
Diese Arbeit wird im Rahmen des Forschungsschwerpunktes „Heterosis in Plants“ von der DFG finanziert.

Literatur

- ABEL, S. and H.C. BECKER, 2007: The effect of autopolyploidy on biomass production in homozygous lines of *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *Plant Breeding* 126:642-643.
- ABEL, S., C. MÖLLERS and H.C. BECKER, 2005: Development of synthetic *Brassica napus* lines for the analysis of „fixed heterosis“ in allopolyploid plants. *Euphytica* 146:157-163.
- OSBORN, T.C., J.C. PIRES, J.A. BIRCHLER, D.L. AUGER, Z.J. CHEN, H.S. LEE, L. COMAI, A. MADLUNG, R.W. DOERGE, V. COLOT and R.A. MARTIENSSEN, 2003: Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* 19:141-147.
- SAAL, B., J. PLIESKE, J. HU, C.F. QUIROS and D. STRUSS, 2001: Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. II. Assignment of rapeseed microsatellites to the A and C genomes and genetic mapping in *Brassica oleracea* L. *Theoretical and Applied Genetics* 102:695-699.
- SOLTIS, P.S. and D.E. SOLTIS, 2000: The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:7051-7057.
- UTZ, H.F., 1994: Plabplan, Computerprogramm zum Erstellen von Plänen für Block- und Gitteranlagen. Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik der Universität Hohenheim, Stuttgart.
- UTZ, H.F., 2004: PLABSTAT. Ein Computerprogramm zur statistischen Analyse von pflanzenzüchterischen Experimenten. Version 3. Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik, Universität Hohenheim.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T.V.D. LEE, M. HORNES, A. FRITERS, J. Pot, J. PALEMAN, M. KUIPER and M. ZABEAU, 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414.

Einflussfaktoren auf den samenbürtigen Infektionskreislauf bei Streifenkrankheit und Netzfleckenkrankheit der Gerste

Manfred Weinhappel^{1*}, Charlotte Leonhardt¹, Ivoneta Diethart² und Wilfried Hartl²

Abstract

Factors influencing the seed borne infection cycle of leaf stripe disease were investigated in a three-year project. Important factors concerning the relationship between seed and field infection levels are environmental conditions (e.g. low temperature during field emergence) on one hand, as well as varieties showing a wide variation in susceptibility. Furthermore significant differences between varieties have been detected, concerning the infection level of the harvested seeds of plots which were neighboured by high infected field, but none of the tested varieties was resistant in this part of the infection cycle.

The results of the studies on net blotch confirmed the importance of the seed borne component of this disease. Especially in early growing stages the disease is highly influenced by the seed infection level. During the growing season factors like variety and environment gain in importance, nevertheless the statistical analysis indicated significant influence of the seed infection in late growing stages as well. The observed yield reduction could be verified by statistical methods in some cases.

Key words:

seed infection, leaf stripe disease, net blotch, field infection rate

Einleitung

Im Rahmen eines Forschungsprojekts von 2005 bis 2007 wurden die Bedeutung und die Einflussfaktoren auf die Samenbürtigkeit bei Streifen- und Netzfleckenkrankheit unter den Bedingungen des biologischen Landbaus untersucht.

Hauptaugenmerk bei den Arbeiten zur Streifenkrankheit (*Drechslera graminea*) lag in der Bestimmung und Quantifizierung der Einflussfaktoren des obligat samenbürtigen Infektionszyklus wie z.B. Höhe der Saatgutinfektion, Vegetationsbedingungen, Ausmaß des Einflusses von infizierten Nachbarparzellen oder Sortenausprägungen. Speziell Keimtemperatur und Sortenresistenz/-toleranz werden als sehr wichtige Einflussfaktor beschrieben. (WALTHER 1980, MÜLLER 2006, NIELSEN 2002)

Netzfleckenkrankheit (*Drechslera teres*) weist ebenfalls eine samenbürtige Komponente auf, wird jedoch auch über weitere Vektoren beeinflusst. Speziell unter den

Bedingungen des biologischen Landbaus ist jedoch auch die Samenbürtigkeit dieser Krankheit von entscheidender Bedeutung. Die Rolle der Samenbürtigkeit der Netzfleckenkrankheit wurde insbesondere in skandinavischen Ländern in letzter Zeit ebenfalls bearbeitet (PINNSCHMID et al. 2005, BRODAL 2006).

Material und Methode

Von 2005 bis 2007 wurden insgesamt 8 Versuche zur Streifenkrankheit durchgeführt, die Versuchsstandorte deckten weitgehend die Sommergerste-Hauptanbauggebiete Österreichs ab.

Das verwendete Sortenspektrum umfasste jene 10 Sommergerstensorten, die zum Projektstart die größte Anbaubedeutung im biologischen Landbau in Österreich hatten. Die Anlage der Versuche erfolgte in einer adaptierten Split-plot Anlage in vierfacher Wiederholung (*Abbildung 1*). Die wichtigsten erfassten Parameter waren:

- Saatgutinfektion mit *Drechslera graminea*
- Feldbefall mit Streifenkrankheit der Gerste
- Infektionsgrad des Erntegutes mit *Drechslera graminea*

Zum Projektteil **Netzfleckenkrankheit** wurden insgesamt zwölf Versuche in denselben Anbaugebieten wie bei der Streifenkrankheit durchgeführt. Saatgut mit drei unterschiedlichen Infektionsniveaus (niedrig - mittel - hoch) und vier Sorten mit unterschiedlichen Anfälligkeitsausprägungen gegenüber Netzfleckenkrankheit wurden verwendet. Die wichtigsten erfassten Parameter waren:

- Saatgutinfektion mit *Drechslera teres*
- Infektionsausmaß im Zwei- bis Dreiblattstadium
- Zwei (drei) weitere Bonituren im Laufe der Vegetationsperiode am Feld

Für die Saatgutuntersuchungen wurde die Agar-Methode gemäß ISTA Working Sheet No. 6 (ANONYMUS 1) angewendet.

Ergebnisse und Diskussion

Das Infektionsausmaß mit Streifenkrankheit an den Erntegutproben von gesunden Parzellen, allerdings benachbart von befallenen Parzellen, schwankte stark und war signifikant unterschiedlich zwischen den Jahren und Orten. Der durchschnittliche Infektionsgrad mit Streifenkrankheit der Gerste lag zwischen 1,6% und 31,1% (*Tabelle 1*). Bei Erntegut von Parzellen, die bereits mit *Drechslera graminea* infiziert

¹ Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Institut für Saatgut, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

² Bio Forschung Austria, Rinnböckstraße 15, A-1110 WIEN

* Ansprechpartner: Dipl.-HLFL-Ing. Manfred WEINHAPPEL, manfred.weinhappel@ages.at

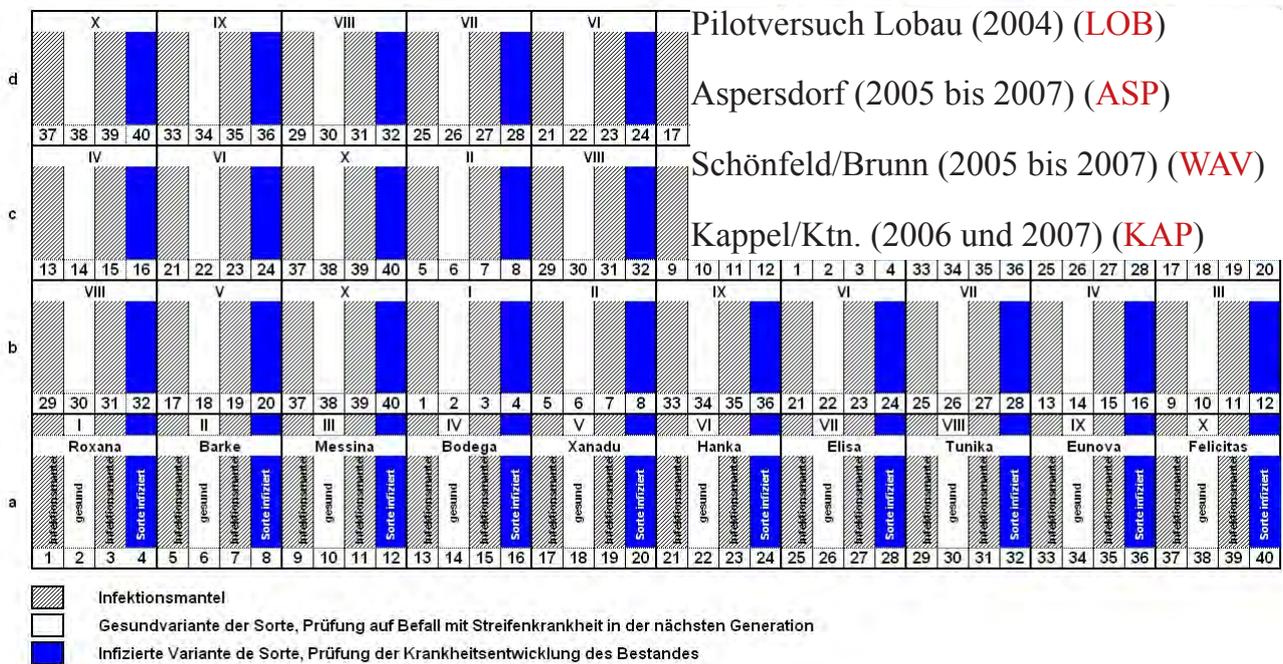


Abbildung 1: Anbauplan der Streifenkrankheitsversuche 2005-2007

Tabelle 1: Durchschnittlicher Befall des geernteten Saatgutes mit *Drechslera graminea* abhängig vom Gesundheitsstatus des Feldbestandes und abhängig von Jahr und Ort

	ASP 2005	ASP 2006	WAV 2006	Anbauort und -jahr KAP 2006	ASP 2007	WAV 2007	LOB 2004
gesunde Parzellen	4,0%	12,9%	1,6%	31,1%	2,6%	6,2%	15,3%
befallene Parzellen	6,1%	14,8%	2,3%	-N-	3,2%	6,5%	19,4%

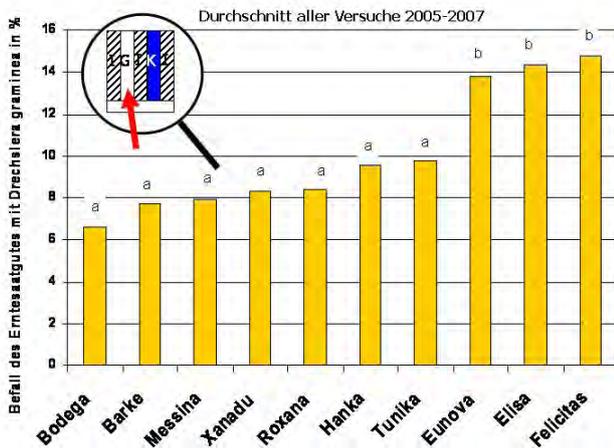


Abbildung 2: Befall mit *Drechslera graminea* des Erntegutes der Gesundenparzellen in Abhängigkeit der Sorte

waren, konnte keine weitere deutliche Erhöhung des Befalls mehr festgestellt werden im Vergleich zu zwar selbst gesunden Parzellen, die aber von erkrankten Parzellen benachbart waren. Die Befallswerte des Erntegutes wurden weiters mittels ANOVA und Duncan-Test verrechnet. Die Befallswerte des Erntegutes von ursprünglich gesunden Parzellen, die aber von erkrankten Parzellen umgeben sind, zeigten auch im Hinblick auf den Faktor „Sorte“ Signifikanz. Bei drei der Sorten konnten signifikant höhere Befallswerte festgestellt werden (Abbildung 2). Weiters war über die gesamte Ver-

suchsreihe von 2005 bis 2007 war die Rangfolge der Sorten hinsichtlich des Erntegutbefalles vergleichbar.

Das Verhältnis von Saatgutbefall zu Feldbefall war bei nahezu allen Versuchen im Rahmen dieses Projektes auf durchschnittlichem bis niedrigem Niveau, bedingt durch den relativ spät ermöglichten Anbau 2005 und 2006 bzw. die überdurchschnittlich hohen Aufgangstemperaturen speziell 2005 und 2007. Bei früheren Streifenkrankheitsversuchen (mit ein bis zwei anfälligen Sorten) zu anderen Fragestellungen wurde häufig (v.a. bei frühen Anbau Terminen) ein Verhältnis Saatgutbefall zu Feldbefall von 1:0,8 und fallweise auch höher festgestellt (WEINHAPPEL 2004).

Im Rahmen der Bewertung des Feldbefalles der Infiziert-Varianten wurden auch Prüfglieder festgestellt, wo trotz entsprechend hohem Ausgangssaatgutbefall kein bzw. sehr niedriger Feldbefall festgestellt wurde (Abbildung 3). Insbesondere bei der Sorte Hanka war dies ausgeprägt. Die Sorten Tunika und Felicitas, als auch Xanadu, Eunova und Elisa wiesen ebenfalls, trotz hoher Saatgutinfektion, hohe Ausbreitungstoleranz im Feldbestand auf. Die im Projekt geprüften Sorten zeigen in dieser Eigenschaft breite Differenzierungen auf. Diese Ergebnisse als auch die Sortenrangfolge decken sich recht gut mit den Ergebnissen aus anderen Projekten (MÜLLER 2006, NIELSEN 2002).

Die Projektversuche zeigten, dass das Infektionsausmaß mit Netzfleckenkrankheit der Gerste (*Drechslera teres*) in frühen Entwicklungsstadien (EC12-13) hoch signifikant vom Befall des Saatgutes abhängig ist. In diesen frühen

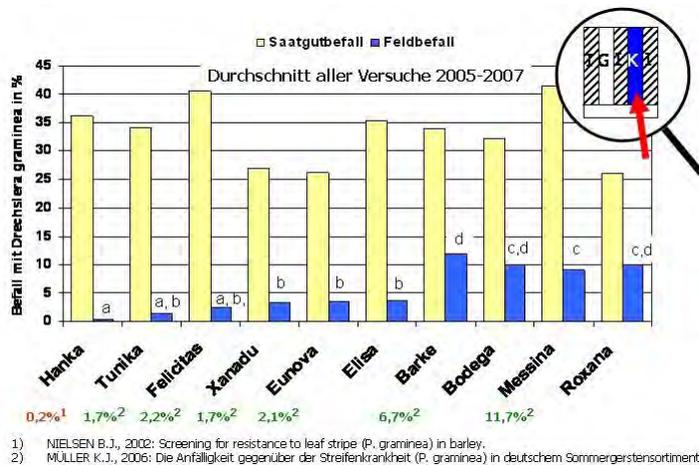


Abbildung 3: Zusammenhang zwischen Saatgutbefall und Befall des Feldbestandes in Abhängigkeit der Sorte

Entwicklungsstadien konnte beim Faktor „Sorte“ kein nachweisbarer Einfluss festgestellt werden. Im Zuge des fortschreitenden Vegetationsverlaufes stieg der Einfluss der Sortenanfälligkeit und der am Versuchsstandort herrschenden Vegetationsbedingungen an. Nichts desto trotz blieb auch bei späteren Boniturterminen bei den meisten Versuchen eine Abhängigkeit des Befalles mit Netzfleckenkrankheit basierend auf den Befall des Ausgangssaatgutes evident, insbesondere bei Bedingungen, die für die Entwicklung der Netzfleckenkrankheit generell förderlich sind.

Ein Durchwirken der Saatgutinfektion letztendlich hin bis zum Ertrag war in der überwiegenden Zahl der Versuche arithmetisch eruiert. Mehrerträge von der Variante „Saatgutbefall niedrig“ zur Variante „Saatgutbefall hoch“ von 100-250 kg wurden oftmals errechnet, wobei diese Differenzen nicht immer statistisch abgesichert werden konnten.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der Streifenkrankheitsversucher zeigten, dass die Höhe der Erntegutinfektion (=das Saatgut für die

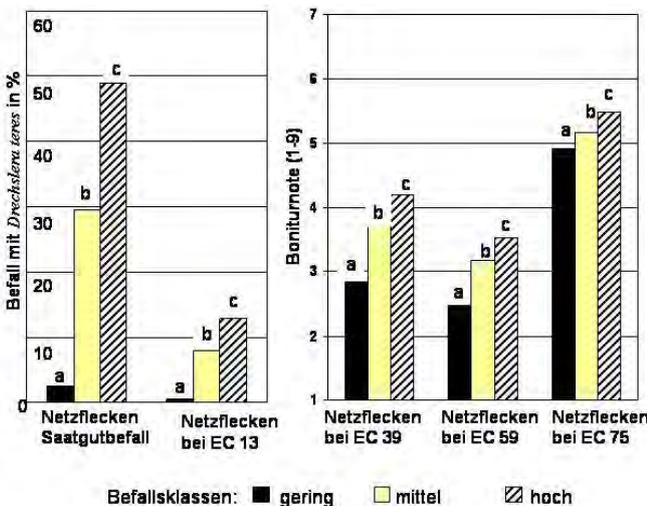


Abbildung 4: Einfluss unterschiedlicher Saatgutbefallshöhen auf die Etablierung der Netzfleckenkrankheit der Gerste im Bestand

nächste Generation) neben der Befallshöhe im Bestand selbst wesentlich von der Infektion der Nachbarfelder, den Umweltbedingungen während der Vegetationsphase, dem Anbauort und der Sorte abhängt. Darüber hinaus zeigten sich deutliche Unterschiede im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen Saatgut- und Feldinfektion; bestimmte Sorten erkrankten am Feld nur sehr gering, obwohl das Saatgut in hohem Maß infiziert war.

Im Rahmen der Arbeiten konnte bei Netzfleckenkrankheit der Gerste ein sehr starker Zusammenhang zwischen Saatgutbefall und Infektionsausmaß von Jungpflanzen festgestellt werden. Speziell in frühen Entwicklungsstadien ist das Ausmaß der Saatgutinfektion der wichtigste Einflussfaktor.

Während der weiteren Bestandes- bzw. Krankheitsentwicklung gewinnen jedoch andere Kriterien wie „Sorte“ oder „Umwelteinflüsse“ an Bedeutung, der Einfluss des Saatgutbefalles blieb jedoch bis zu einem gewissen Grad evident.

Speziell für den biologischen Anbau zeigten die Projektarbeiten, dass die Gesundheit des Saatgutes eine wichtige vorbeugende Maßnahme zur Vermeidung dieser Krankheiten darstellt. Ein weiterer wichtiger Aspekt von gesundem Saatgut ist die Sicherstellung eines hohen phytosanitären Niveaus in den einzelnen Anbauregionen.

Danksagung

Ein spezieller Dank gilt dem Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt- und Wasserwirtschaft sowie den Bundesländern, die dieses Projekt finanzierten.

Literatur

ANONYMUS 1, 1981: ISTA Handbook on Seed Health Testing. Section 2 Working Sheets. Intern. Seed Testing Association, Zürich, Switzerland.

BRODAL, G. and B. HENRIKSEN, 2006: Thresholds for seed borne diseases in organic cereal seed. Proceedings of the 3rd Seed Health Conference 2006 in Bydgoszcz, Poland, 51.

MÜLLER, K.J., 2006: Die Anfälligkeit gegenüber der Streifenkrankheit (*Pyrenophora graminea*) im deutschen Sommergerstensortiment unter natürlichen Befallsbedingungen im ökologischen Landbau. Abschlussbericht zum gleichlautenden Forschungsprojekt, Aktenzeichen 514-43.10/03OE 022 gefördert vom BM für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Berlin.

NIELSEN, B.J., 2002: Screening for resistance to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in barley. Proceedings to the second International Workshop on barley Leaf Blights, 7-11 April 2002, ICARDA, Aleppo, Syria, 277-280.

PINNSCHMIDT, H., B. NIELSEN and H. HANSEN, 2005: Quantitative relationships in the infection cycle of seed borne net blotch. Proceedings of the 5th ISTA Seed Health Symposium 10-13 May 2005, Angers, France, 7.

WALTHER, H.-F., 1980: Biologische Grundlagen zur Wirkung Hg-freier, systemischer Fungizide gegen *Drechslera graminea*, dem Erreger der Streifenkrankheit der Gerste. Dissertation an der Technischen Universität München.

WEINHAPPEL, M., 2004: Ähnlich und doch sehr verschieden - Streifenkrankheit und Netzfleckenkrankheit der Gerste. Der Pflanzenarzt 3/2004, 57 Jahrgang, 8-10.

Enzymatische Löslichkeit von Glutenin als Indikator für die Anfälligkeit gegen Wanzenstich

Manfred Werteker^{1*} und Gabriela Kramreither¹

Abstract

Trials of winter wheat, harvested in 2003 were severely infested by naturally occurring bugs (*Eurygaster* sp.). Bug damage was determined in these trials by selecting and weighing the infested kernels. The determination of Glutenin degradation was done by the addition of meal from bug-infested kernels to meal from sound kernels from the same trials. So sample mixtures representing a degree of bug attack of 6 % were prepared. Mixtures and blanks made from sound meal were incubated for digestion of Glutenin. RP-HPLC-analysis was used for the measurement of the reduction in glutenin content due to the activity of bug proteinases and the results of damaged and sound samples were compared. Good correlations between the degree of bug attack and the digestibility of glutenin could be observed. The variety specificity of both parameters could be confirmed. The determination of digestibility of glutenins was repeated in material from a trial harvested in 2005 in another location in eastern Austria for confirmation of the results. A correlation with the degree of bug attack in trials from the harvest 2003 was found again.

Key words: Wheat bugs, degradation of glutenin, baking quality, HPLC

Einleitung

Durch Getreidewanzen (*Eurygaster* spp., *Aelia* spp.) wird in Jahren mit besonders heißer und trockener Witterung erheblicher Schaden an Vulgare- und Durumweizen verursacht. Die österreichischen Qualitätsweizengebiete sind infolge ihres semi-ariden Klimas bei ungünstigem Verlauf der Jahreswitterung erheblich durch diesen Schädling bedroht. Insbesondere durch die allgemein beobachtete Klimaerwärmung ist langfristig mit einer Zunahme der Schäden zu rechnen.

Wanzenstich wirkt sich durch erhebliche Beeinträchtigung der technologischen Qualität von Weizen aus. So wird etwa von einer Verringerung des Tausendkorngewichtes berichtet. Wesentlich ist jedoch vor allem die Beeinträchtigung der teigrheologischen Eigenschaften und die Entstehung von klebrigen Teigen (SARIC et al. 2004, BERGER et al. 1974). Schädigungen sind jedoch nicht nur bei Vulgareweizen zu beobachten. Auch die Kocheigenschaften der aus

befallenem Durumweizen hergestellten Teigwaren werden negativ beeinflusst (PETROVA 2002).

Die Qualitätsverluste werden durch proteolytische Enzyme verursacht, die durch den Wanzenspeichel während des Saugaktes in das bestochene Korn eingebracht werden, verursacht. Durch Wanzenproteasen wird ausschließlich Glutenin abgebaut, wobei sich die Substratspezifität der Speichelenzyme der Wanzen der nördlichen Hemisphäre (*Eurygaster* spp., *Aelia* spp.) sowohl auf HMW- als auch auf LMW-Glutenine erstreckt (SIVRI et al. 1998). Die Intensität des Abbaues wird aber auch durch genetische Faktoren der Sorte des befallenen Weizens beeinflusst (ROSELL et al. 2002, SIVRI et al. 2002).

Methoden

In der vorliegenden Studie wurden die Sorten Altos, Antonius, Astaro, Atrium, Capo, Edison, Eurofit, Josef, Komfort, Levendis, Ludwig, Lukas, Renan, Saturnus, SW-Kronos, SW-Maxi und Xenos sowie die Prüfstämme SE 310/01, SZD 271/90-3, SZD 2319 AB und SZD 4055 aus den Sortenversuchen in Albrechtsfeld und Staasdorf (Ernte 2003) herangezogen. Weitere Versuche wurden mit den Sorten Altos, Antonius, Astaro, Capo, Edison, Ludwig, Saturnus und SW-Maxi aus Großnondorf (Ernte 2005) durchgeführt.

Die Abbaubarkeit des Glutenins wurde durch Zugabe von 6 % Schrot aus wanzenstichigen Körnern der Sorte Saturn (Albrechtsfeld, Ernte 2003) zu Schrot aus wanzenstichfreien Körnern der zu untersuchenden Sorte untersucht. Der Gluteninabbau erfolgte durch Bebrütung bei 35°C auf einem Schüttler während 45 Minuten. Zur Bestimmung des Gluteninabbaues gelangte eine Osborne-Trennung mit anschließender HPLC-Analyse zum Einsatz (WIESER et al. 1998). Die Berechnung des Gluteninabbaues erfolgte durch Bildung der Differenz aus den Gluteningehalten der künstlich kontaminierten Proben und der gesunden Proben. Die Bestimmung des Wanzenstichbefalles wurde nach der EU-Norm (EC) No. 824/2000 durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Zwischen natürlichem Wanzenstichbefall und Gluteninabbau unter standardisierten Bedingungen konnten gute Korrelationen gefunden werden (Albrechtsfeld: $R^2=0.69$, $P<0.01$; Staasdorf: $R^2=0.36$, $P<0.01$). Die Abbauprobe wurden an Proben der Ernte 2005 (Großnondorf) wiederholt.

¹ Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Institut für Sortenwesen, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

* Ansprechpartner: Dr. Manfred WERTEKER, manfred.werteker@ages.at

Die Ergebnisse korrelierten ebenfalls mit dem Wanzenstichbefall aus Albrechtsfeld der Ernte 2003 ($R^2=0.61$, $P<0.01$). Der Gluteninabbau lag bei allen Versuchen im Bereich zwischen 5 und 25mg/g Schrot.

Aus den Ergebnissen resultiert, dass eine genetisch bedingte leichtere Abbaubarkeit des Glutenins in doppeltem Sinne negativen Einfluss auf die Qualität des Getreides nimmt. Einerseits ist die Beeinträchtigung der technologischen Qualität bei Sorten mit leichter abbaubarem Glutenin eine stärkere. Andererseits wird aber auch der Wanzenstichbefall des Getreides erhöht, wodurch sich eine weitere Schädigung der Qualität ergibt.

Die Tatsache, dass der Gluteninabbau bei allen 3 untersuchten Versuchen etwa im gleichen Bereich liegt, lässt den Schluss zu, dass Umwelteinflüsse kaum eine Rolle für die Anfälligkeit des Glutenins gegen enzymatischen Abbau spielen. Hingegen wurde durch die Wiederholbarkeit des Zusammenhanges zwischen künstlichem Gluteninabbau an Proben aus der Ernte 2005 von einer bisher in der Versuchsanordnung nicht berücksichtigten Versuchsstelle mit den Ergebnissen der Wanzenstichbestimmung aus der Ernte 2003 die Heritabilität des Gluteninabbauverhaltens deutlich bestätigt.

Die Durchführung des Gluteninabbaues mit Wanzenproteinasen unter standardisierten Bedingungen bietet durch den Zusammenhang dieses Parameters mit dem Wanzenstichbefall die Möglichkeit, die Anfälligkeit einer Sorte gegen Wanzenstich zu prüfen.

Anmerkung

Die Studie wurde in ausführlicher Form veröffentlicht in: WERTEKER, M. und G. KRAMREITHER, 2008: Relation

between susceptibility to wheat bug attack and digestibility of glutenin. *Journal of Cereal Science* 47. 226-232

Literatur

- BERGER, M., P. GRANDVOINNET, J.F. De la GUÉRIVIÈRE, G. BRUSSIÈRE, 1974: Tests de rhéologie pratique utilisables pour l'appréciation des activités protéolytiques. *Annales Technol. Agriculures* 23, 233-239.
- COMMISSION REGULATION (EC) No. 824/2000 of 19 April 2000 establishing procedures for the taking-over of cereals by intervention agencies and laying down methods of analysis for determining the quality of cereals.
- PETROVA, I., 2002: Effect of bug damage on cooking potential of Bulgarian durum wheat cultivars depending on their gluten strength. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 8, 245-250.
- ROSELL, C.M., S. AJA, S. BEAN and G. LOOKHART, 2002a: Effect of *Aelia* spp. and *Eurygaster* spp. Damage on Wheat Proteins. *Cereal Chemistry* 79, 801-805.
- SARIC, M., -. PSODOROV, D. ZIVANEV and M. KOSUTIC, 2004: Deviation of processing quality of wheat caused by wheat bug (*Eurygaster*) infestation. Flour-Bread-03: 4th Croatian Congress of Cereal Technologists, Opatia, Croatia 48-56.
- SIVRI, D., H. KOKSEL and W. BUSHUK, 1998: Effect of wheat bug (*Eurygaster maura*) proteolytic enzymes on electrophoretic properties of gluten proteins. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 26. 117-125.
- SIVRI, D., H.D. SAPIRSTEIN, W. BUSHUK and H. KÖKSEL, 2002: Wheat intercultivar differences in susceptibility of glutenin protein to effects of bug (*Eurygaster integriceps*) Protease. *Cereal Chemistry* 79, 41-44.
- WIESER, H., S. ANTES and W. SEILMEIER, 1998: Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry* 75, 644-650.

Virusfreimachung von alten Kartoffelsorten mittels Gewebekulturtechniken unter Einsatz von Ribavirin

M. Granilshikova, E. Kopper^{1*}, M. Schwab und R. Zederbauer

Zusammenfassung

Als arbeits- und kostensparende Alternative zur traditionellen Virusfreimachung durch Meristemkultur wurde der Einsatz von Ribavirin, einem synthetischen Replikationshemmer erfolgreich an einigen Kartoffelherkünften aus der Genbank AGES-LINZ erprobt.

Vorkultur

1. Kartoffelhälften in eine Magenta-Box auf steriles Seramis-Substrat legen und mit etwas Seramis bedecken.
2. Die Knollenhälften mit filtersterilem MS0+GA3 2 mg/L beschichten und
3. bei 28°C im Dunkeln inkubieren



Kultivierung

Knollenhälften bei Pilzbefall sofort mit einem dafür zugelassenen Fungizid behandeln und wöchentlich mit sterilem MS0+GA3, 2 mg/L beschichten.



Virusbefreiung

Triebspitzen von pathogenbefreiten Pflanzen schneiden und in Eprouvetten mit MS-Medium+IBA 0,1 mg/L+GA3 0,3 mg/L+Ribavirin 50 mg/L+2% Saccharose+0,8 % Agar/L 3-4 Wochen bei 24°C, 12 Stunden Licht, kultivieren. ELISA-Test auf Virusbefall durchführen. Falls die Pflanzen nicht virusfrei sind, sind wie unter Punkt 1 beschrieben, erneut Triebspitzen zuschneiden.



Sterilisation

1. Die ganze Knolle mit Seife waschen und unter fließendem Wasser 20 Minuten spülen.
2. In 70% ETOH+25 mg/L Saponin 20 Minuten rühren.
3. In 20% Danchlor 20 Minuten rühren.
4. In 2% HgCl₂ 20 Minuten rühren, halbieren und
5. 3x mit sterilem Wasser spülen und trocknen lassen.

Akklimatisierung

2-3 cm lange, bewurzelte Pflanzen pikieren, 3-4 Wochen akklimatisieren, umtopfen und in einer vektorfreien Quarantänekabine bis zur Knollenreife kultivieren.

Literatur

- CONRAD, P.L., 1991: Potato virus S-free plants obtained using antiviral compounds and nodal segment culture of potato. American Journal of Potato Research Vol. 68, 507-513.
- DHITAL, S.P., B.M. SAKHA and H.T. LIM, 2006: Utilization of Shoot Cuttings for Elimination of PLRV and PVY by Thermotherapy and Chemotherapy from Potato (*Solanum tuberosum* L.). Nepal Journal of Science and Technology, Vol 7.

¹ AGES, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

* Ansprechpartner: Dr. Elisabeth KOPPER, elisabeth.kopper@ages.at

Survey of winter barley fields for leaf spot diseases: epidemic spread of *Ramularia* leaf spot in Hungary in 2008

Klára Manninger^{1*}, T. Mátrai² and I. Muranyi³

Summary

Winter barley fields were surveyed for leaf spot diseases in Hungary in the vegetation periods 2005 to 2008. Based on microscopic examination, *Pyrenophora* species were the dominant pathogens on winter barley in 2006. There were no necrotic spots on the upper leaf of winter barley in experimental plots until flowering, in the middle of May 2007. However, little spotty marks appeared on the upper leaves in Rőjtökmuzsaj (West-Hungary) after the florescence of winter barley. The microscopic test of infected leaves proved the leaf spots were caused by *Ramularia collo-cygni* (SUTTON et WALLER). *Ramularia* leaf spot disease was recorded for the first time on winter barley in Hungary. Spread of *Ramularia collo cygni* was confirmed in different geographical areas of Hungary in 2008. Occurrence of the pathogen was sporadic in East-Hungary, while a heavy attack on winter and spring barley was seen in West-Hungary. An epidemic spread of *Ramularia* leaf spot disease was noticed on irrigated field in Székkutas (South-Hungary).

The examined Hungarian winter barley varieties in Székkutas showed a wide range of *Ramularia* leaf spot disease reaction, from nearly resistant to very susceptible. Some genotypes used for breeding were with high resistance.

Keywords: winter barley, *Pyrenophora* species, *Ramularia collo-cygni*, *Ramularia* leaf spot, epidemic

Introduction

Barley is an intensively cultivated cereal grown worldwide. Fungal pathogens causing leaf spot on barley such as *Pyrenophora* species, *Rhynchosporium secalis*, and *Bipolaris sorokiniana* are important pathogens wherever barley is grown. Since the early 1990's another emerging leaf spot pathogen *Ramularia collo-cygni* has spread on barley, too. *Ramularia* leaf spot has become one of the most important diseases of barley in Central and Northern Europe. Still now *Ramularia* leaf spot disease was not known in Hungary. Objectives of our research were:

- 1) Survey of barley fields for leaf spot diseases in Hungary during 2005-2008.
- 2) Recording of the occurrence and distribution of *Ramularia* leaf spot disease in Hungarian barley growing areas.

3) Determination of the level of resistance to *Ramularia* leaf spot in cultivated Hungarian barley varieties and in genotypes used for breeding.

Materials and Methods

Leaf samples with necrotic spot symptoms were collected from various barley varieties during 2005-2008 at six locations in Hungary (Debrecen, Kompolt, Mosonmagyaróvár, Rőjtökmuzsaj, Székkutas, and Szombathely/Táplánszentkereszt). Infected leaves were placed in Petri dishes and kept at natural room lighting at 18-20 °C for two days. Leaf spots were scrutinised with stereo and light microscope. Determination of disease severity was based on examination of samples collected after flowering. Barley varieties were grouped on the basis of disease severity (leaf area covered with necrotic spots): weak (1-10 %), medium (10%-30 %) and severe (30 % or more).

Results and Discussion

A progressive increase in the occurrence and spread of leaf spot pathogens was detected in Hungary in 2006. *Pyrenophora* species were the predominant pathogens on winter barley. However, a new infection episode was defined in 2007. It was expected that *Pyrenophora* species can cause again severe leaf spot diseases, but the drought limited the spread of these pathogens in April. In this year, we detected little necrotic spots on the upper leaves after the flowering of winter barley. The microscopic examination of the spotted leaves suggested that these leaf spots were caused by *Ramularia collo-cygni*. The shape and size of conidiophores and conidia demonstrated the presence of this pathogen.

This new disease, *Ramularia* leaf spot was recorded for the first time on winter barley in Hungary in 2007. Spread of *Ramularia collo cygni* was confirmed in different geographical areas of Hungary in 2008. Occurrence of the pathogen was sporadic in Kompolt and Debrecen (East-Hungary), while a heavy attack on winter and spring barley was in Rőjtökmuzsaj and Szombathely (West-Hungary). An epidemic spread of *Ramularia* leaf spot disease was noticed on irrigated research field in Székkutas (South-Hungary).

The resistance of Hungarian varieties and genotypes used for breeding to *Ramularia* leaf spot was characterised. All examined Hungarian winter barley varieties were susceptible. Severity of disease on winter barley varieties showed

¹ Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Sciences, Budapest

² Agromag Ltd, Szeged

³ Károly Róbert University, Fleischmann Rudolf Research Institute, Kompolt

* Contact: Klára MANNINGER, sman@nki.hu

a wide range: from nearly resistant to very susceptible. A number of winter genotypes were resistant.

Conclusions

Our survey results justify the necessity of a strategy to control the new dangerous disease, *Ramularia* leaf spot of barley, which widespread in Hungary. A close collaboration of scientists from neighbouring countries is especially required.

References

ANONYMUS, 2006: Book of abstracts of the First European *Ramularia* Workshop, 12-14 March 2006, Georg August University Göttingen, Germany pp. 1-49.

MANNINGER, S., L. VAJNA és I. MURÁNYI I, 2007: Új betegség, a *Ramuláriás* levélfoltosodás hazai előfordulása őszi árpán. Korokozó. *Ramularia collo-cygni* Sutton B és Walter JM Növényvédelem 43 (9) 421-423.

MANNINGER, K., L. VAJNA and I. MURÁNYI, 2007: Occurrence of *Ramularia* leaf spot on winter barley in Hungary. Bericht über die 58. Tagung 2007 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkäufer Österreichs, LFZ Raumberg-Gumpenstein, 20-22. November 2007. Abstract, p. 115.

SUTTON, B.C., 1991: *Ramularia collo-cygni* C.M.I. Desr. Pathog. Fungi Bact. 1039: 1-2.

Acknowledgement

The authors are grateful for the financial support, the investigation was supported by GAK 2005 of NKTH grant (No.rezarpak, OMFB 0936/2005).

Wirkung langjähriger Erhaltungszüchtung auf Anbaueigenschaften, Ertrag und Qualität der Roggensorte EHO-Kurz

Michael Oberforster^{1*}, Konrad Schulmeister² und Wolfgang Kainz³

Abstract

The effects of maintenance breeding on open-pollinated winter rye (*Secale cereale* L.) were analyzed in cultivar 'EHO-Kurz', which was registered in 1965 in Austria. The studied populations derived from (1) up-to-date certified seed and (2) from seed material which was stored in a genebank in the early 1970s. Several examinations on the development of plants were carried out in 19 field trials in the years 1999/2000 and 2000/2001. Tolerance against snow mould (*Microdochium nivale*) was evaluated in two additional field trials with small plots. Maintenance breeding led to the following results: shorter straw length (-6 cm), lower lodging (-1.6 score), lower density (-36 ears per square meter), higher thousand kernel weight (+2.5 g), more kernels per ear (+2.6 kernels), higher yield (+0.27 tons per hectare). In almost all cases the differences were statistically not significant. However, for the value for cultivation and use (VCU) the improvement in lodging tolerance was important.

Zusammenfassung

Es wurden Effekte der Erhaltungszüchtung bei der im Jahr 1965 in Österreich registrierten Roggensorte EHO-Kurz analysiert. Die Aufwüchse aus zertifiziertem Saatgut und einem zu Beginn der 1970er Jahre eingelagerten Genbankmuster standen im Vergleich. Zu diesem Zweck wurde in den Jahren 1999/2000 und 2000/01 eine mehrortige Prüfung (insgesamt 19 Versuche mit Ertragsauswertung, 2 Schneeschimmelregister) angelegt. Die Maßnahmen der Erhaltungszüchtung zeigten folgende Ergebnisse: kürzerer Wuchs (-6 cm), geringere Lagerung (-1,6 Noten), geringere Bestandesdichte (-36 Ähren/m²), höheres Tausendkorngewicht (+2,5 g), höhere Kornzahl pro Ähre (+2,6 Körner), gesteigerter Kornertrag (+2,7 dt/ha). Zumeist waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Für den landeskulturellen Wert war die Verbesserung der Standfestigkeit bedeutsam.

Keywords:

Maintenance breeding, rye, *Secale cereale*, yield

Einleitung

Die Züchtung der Winterroggensorte (*Secale cereale* L.) Edelhofer Neu wurde im Jahr 1949 begonnen. Er entstammt

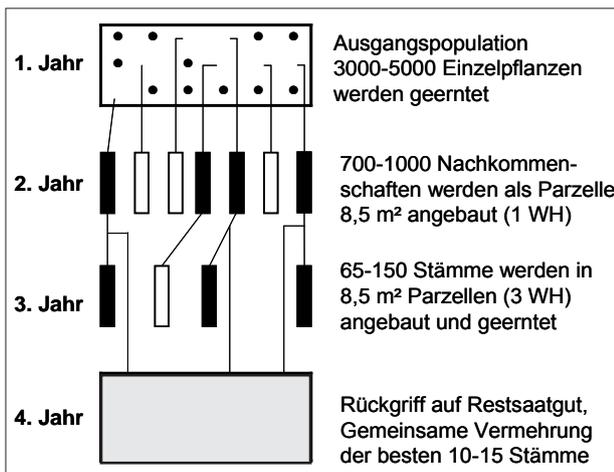


Abbildung 1: Schema der Sortenerhaltung (Restsaatgutmethode) bei der Winterroggensorte EHO-Kurz

der Kreuzung von Edelhofer, eines früher im Waldviertel vielfach angebauten Roggens, mit Petkuser Kurzstroh. Am 14. Oktober 1965 erfolgte die Aufnahme in das österreichische „Zuchtbuch für Kulturpflanzen“. Im Jahr 1970 wurde die Bezeichnung in EHO-Kurz abgeändert (BODEN 1970). Die Sorte ist nach wie vor am Markt, ihre Hochblüte hatte sie in der Zeit von 1980 bis 2000. Bis dato umfassen die inländischen Saatgutvermehrungen von EHO-Kurz 23.706 Hektar (1966 bis 2008). Zeitweilig war die Hälfte der Roggenfläche Österreichs mit EHO-Kurz bestellt. Kleinere Produktionen gab es in auch in anderen europäischen Ländern. EHO-Kurz stand vorwiegend auf mittleren und geringeren Böden, in rauerer Lagen des Mühl- und Waldviertels war er allgemein verbreitet. Die Kombination aus mittelfrüher Reife, überdurchschnittlicher Ertragsstabilität und günstiger Kornausbildung wurde von vielen Landwirten geschätzt.

Material und Methoden

Wie sich die genetische Leistungsfähigkeit einer Sorte durch Maßnahmen der Erhaltungszucht ändert, wird üblicherweise nicht analysiert. Im vorliegenden Fall konnten wir den methodischen Problemen durch einen Rückgriff auf

¹ Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Sortenwesen, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

² Landwirtschaftliche Fachschule Edelhof Saatucht, Edelhof 1, A-3910 ZWETTL

³ Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Kartoffel und pflanzengenetische Ressourcen, Wieningerstr. 8, A-4020 LINZ

* Ansprechpartner: Dipl.-Ing. Michael OBERFORSTER, michael.oberforster@ages.at

Tabelle 1: Vergleich von Anbau- und Resistenzeigenschaften, von Kornertrag, Ertragskomponenten sowie Qualitätsmerkmalen der Roggensorte EHO-Kurz (zertifiziertes Saatgut) mit einem EHO-Kurz aus der Genbank

Merkmal	Anzahl	EHO-Kurz Genbank	EHO-Kurz Z-Saatgut	Differenz	Signifikanz
Anbaueigenschaften					
Ährenschieben (BBCH 59)	18	07.Mai	07.Mai	±0	n.s.
Gelbreife (BBCH 87)	16	11.Juli	11.Juli	±0	n.s.
Wuchshöhe, cm	19	156	150	-6	n.s.
Lagerung, 1-9	34	5,6	4,0	-1,6	sign.
Halmknicken, 1-9	7	3,9	3,1	-0,8	n.s.
Resistenzeigenschaften					
Mehltau, 1-9	12	3,7	4,1	+0,4	n.s.
Braunrost, 1-9	34	5,4	5,8	+0,4	n.s.
Schwarzrost, 1-9	5	3,4	2,8	-0,6	n.s.
Rhynchosporium, 1-9	4	4,7	4,8	+0,1	n.s.
Schneeschnitzel, 1-9	10	3,0	2,5	-0,5	n.s.
Auswuchs (Erntegut), Gew.-%	3	6,9	7,0	+0,1	n.s.
Auswuchs 1 (Labor), 1-9	19	4,6	5,4	+0,8	n.s.
Auswuchs 2 (Labor), 1-9	19	7,7	8,4	+0,7	n.s.
Kornertrag, Ertragskomponenten					
Kornertrag (86% TS), dt/ha	19	60,0	62,7	+2,7	n.s.
Kornfeuchte bei Ernte, %	19	14,6	14,4	-0,2	n.s.
Bestandesdichte, Ähren/m ²	19	444	408	-36	n.s.
Kornzahl pro Ähre	19	46,7	49,3	+2,6	n.s.
Einzelährengewicht (86% TS), g	19	1,37	1,56	+0,2	n.s.
Geerntete Kornzahl pro m ²	19	20.530	19.877	-653	n.s.
Tausendkorngewicht (86% TS), g	19	29,1	31,6	+2,5	n.s.
Qualität					
Hektolitergewicht, kg	19	73,0	72,7	-0,3	n.s.
Fallzahl, s	19	123	113	-10	n.s.
Amyl.-Viskositätsmaximum, AE	18	469	468	-1	n.s.
Amyl.-Verkleisterungstemperatur, °C	17	65,1	65,1	±0,0	n.s.

BBCH: Entwicklungsstadien bei Getreide

Boniturnote 1-9: 1 = kein, ... 5 = mittleres, ... 9 = sehr starkes Auftreten

Signifikanz: T-Test (α -Fehler = 0,05)

tiefgekühltes Saatgut entgehen. Eine zu Beginn der 1970er Jahre in die Genbank der ehemaligen Landwirtschaftlich-chemischen Bundesversuchsanstalt Linz eingelagerte Akzession von EHO-Kurz (BVAL 113002) wurde nach einmaliger Zwischenvermehrung mit dem Aufwuchs aus zertifiziertem Saatgut der Ernten 1999 und 2000 verglichen. Die insgesamt 19 Ertragsversuche und 2 Schneeschimmelregister (*Microdochium nivale*) waren in die offizielle Sortenwertprüfung 1999/2000 und 2000/01 integriert. Die Datenerhebung erfolgte gemäß den Methoden für Saatgut und Sorten (BUNDESAMT 2002). Es handelte sich um Blockanlagen und Zweisatzgitter mit vierfacher Wiederholung der Objekte. Bei den Ertragsprüfungen variierte die Saatstärke im Bereich von 280 bis 350 keimf. Körnern/m² und die Parzellengröße von 10,0 bis 13,8 m². Für die statistische Analyse stand das Programmpaket SPSS Vers. 16.0 zur Verfügung (JANSSEN und LAATZ 2007).

Ergebnisse und Diskussion

Für fremdbefruchtende Arten sind mechanische Vermischungen, Mutationen, die natürliche Einkreuzung von sortenfremden Beständen oder Pflanzen und die genotypische Variation innerhalb einer Sorte von Bedeutung (SCHNELL 1977). Ziel der Erhaltungszucht war es, die Leistungsfähigkeit der Sortenpopulation unter Berücksichtigung der Homogenität und Beständigkeit zu steigern. Die im Jahr 1921 von LAUBE (1925) eingeführte Restsaatgutmethode ermöglicht eine begrenzte Befruchtunglenkung. Dabei werden positiv bewertete Nachkommenschaften im Folgejahr mit überlagertem Saatgut nochmals angebaut. Die von

diesen Nachkommen produzierte Pollenwolke enthält in höherer Häufigkeit gute Erbanlagen (MIEDANER 1997).

Durchführung der Erhaltungszüchtung

Die Maßnahmen der züchterischen Erhaltung von EHO-Kurz haben im Lauf der Zeit gewisse Anpassungen erfahren (vgl. BODEN 1970, SCHULMEISTER 1990, GRAF 2001).

Zuletzt wurden von 3.000 bis 5.000 nach ihrem äußeren Erscheinungsbild selektierten Pflanzen zwischen 700 und 1.000 Nachkommenschaften ausgesät. Eine Einengung auf

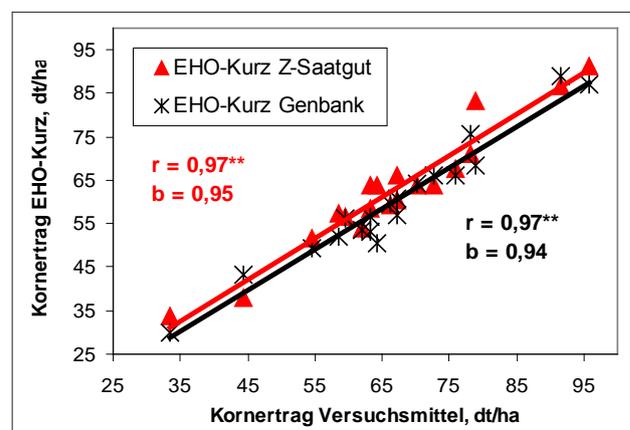


Abbildung 2: Ertragsreaktion der Roggensorte EHO-Kurz (zertifiziertes Saatgut) und EHO-Kurz aus der Genbank auf unterschiedliche Bodenbonität

100 bis 150 Stämme fand statt. Diese wurden wiederum hinsichtlich ihrer Leistung beurteilt. Bei den besten 10 bis 15 Stämmen wird auf das Restsaatgut zurückgegriffen (*Abbildung 1*). Dieser Zyklus wiederholte sich in zeitlichen Abständen.

Ergebnisse

Die aufwändigen Maßnahmen der Sortenerhaltung hatten einen um 6 cm kürzeren Wuchs, ein signifikant geringeres Lager (-1,6 Boniturnoten), ein geringeres Halmknicken (-0,8 Noten) und eine tendenziell höhere Toleranz (-0,5 Noten) gegenüber Schneeschimmel (*Microdochium nivale*) zur Folge. In der Beschreibenden Sortenliste würde die Genbankherkunft von EHO-Kurz im Merkmal Lagerung um zwei Ausprägungsstufen schlechter bewertet. Zur verbesserten Standfestigkeit dürfte neben der reduzierten Halmlänge insbesondere die geänderte Ertragsstruktur beigetragen haben. Die Bestandesdichte war durchschnittlich um 8 % (36 Ähren/m²) geringer. Im Gegenzug stiegen die Kornzahl pro Ähre um 6 % (2,6 Körner) und das Tausendkorngewicht um 9 % (2,5 g) an. Allerdings lassen sich diese Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % statistisch nicht absichern. Von Mehltau (*Blumeria graminis*) und Braunrost (*Puccinia recondita*) waren die aus zertifiziertem Saatgut erwachsenen Bestände etwas mehr infiziert (+0,4 Noten). Der Kornertrag nahm vergleichsweise wenig und nicht signifikant um +2,7 dt/ha zu (*Tabelle 1*). Auf eine Zeitspanne von 25 Jahren bezogen, sind das lediglich 0,18 % jährlich. Dagegen gibt PANSE (1970) eine mittlere Steigerung von 0,4 bis 0,5 % pro Jahr an. Auf zunehmende

Bodenbonität, ausgedrückt als mittleres Ertragsniveau von sieben Roggensorten, reagieren beide trotz unterschiedlicher Standfestigkeit identisch ($b = 0,94$ bzw. $0,95$, siehe *Abbildung 2*). In Hinblick auf die Auswuchsfestigkeit und Fallzahlstabilität brachte die Erhaltungszüchtung keine positiven Wirkungen.

Literatur

- BODEN, J., 1970: Entstehung und Erfolge des Winterroggens „Edelhofer Neu“. Bericht Arbeitstag der Vereinigung österreichischer Pflanzzüchter, Gumpenstein, 82-91.
- BUNDESAMT und Forschungszentrum für Landwirtschaft (Hrsg.), 2002: Methoden für Saatgut und Sorten. Richtlinien für die Sortenprüfung. Sorten- und Saatgutblatt, Schriftenreihe 59/2002 des BFL.
- GRAF, M., 2001: EHO-Kurz, eine Roggensorte im Wandel der Zeit. Diplomarbeit HBLA Pitzelstätten.
- JANSSEN, J. und W. LAATZ, 2007: Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows. Heidelberg: Springer. 6. Auflage.
- LAUBE, W., 1925: Einige Fragen über die praktische Roggenzüchtung. Beitrag zur Pflanzenzucht 8, 73-89.
- MIEDANER, T., 1997: Roggen: Vom Unkraut zur Volksnahrung. Frankfurt/Main, DLG-Verlag.
- PANSE, E., 1970: Qualitäts- und Züchtungsfragen bei Roggen. Getreide und Mehl 20, 4, 30-31.
- SCHNELL, F.W., 1977: Methodische Grundlagen und Probleme der Erhaltungszüchtung bei Fremdbefruchtern. Bericht Arbeitstagung der Vereinigung österreichischer Pflanzzüchter, Gumpenstein, 113-122.
- SCHULMEISTER, K., 1990: EHO, der gesunde Roggen aus dem Waldviertel. Blick ins Land 25 (9), 31.

Identifizierung von Resistenzgenen in Winterweizen (*Triticum aestivum*) gegenüber *Fusarium graminearum*

Markus Rhiel^{1*}, Manuela Diethelm², Carola Wagner¹, Günther Schweizer² und Wolfgang Friedt¹

Abstract

The aim of this project is the identification and mapping of genes involved in *Fusarium* head blight resistance in the winter wheat using the cross populations Dream x Lynx, G16-92 x Hussar and SVP x Capo.

Keywords

Fusarium head blight, winter wheat, Affymetrix GeneChip analysis, resistance, RT-PCR

Pilzpathogene der Gattung *Fusarium* haben weltweit erhebliche Auswirkungen auf den Ertrag und die Verarbeitungsqualität von Weizen. *Fusarium*-Befall der Weizenähren führt häufig zu Kontaminationen des Erntegutes mit Pilzgiften (Mykotoxinen). Die toxische Belastung von Weizenmehl und Brot birgt ein hohes Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier.

Ziel des hier vorgestellten Projektes ist die Identifizierung von Genen in verschiedenen Winterweizensorten, die an der Abwehrreaktion der jeweiligen Genotypen beteiligt sind. Hierfür werden die drei Kreuzungspopulationen Dream x Lynx, G16-92 x Hussar and SVP x Capo verwendet.

Die Eltern der drei Winterweizen-Populationen Dream (resistent), Lynx (anfällig), G16-92 (res.), Hussar (anf.), SVP (res.) und Capo (anf.) wurden einer Einzelährcheninokulation mit dem *Fusarium graminearum*-Stamm IFA65 (Tulln) unterzogen. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden drei bis acht Tage nach der Inokulation Ährenproben genommen. Das Pilzgewebe wurde mit dem Farbstoff WGA (*wheat germ agglutinin*) Komplex Alexa Fluor® 488 angefärbt. Ährenproben der Eltern Dream und Lynx wurden 32 und 72 Stunden nach der Inokulation einer Affymetrix GeneChip Analyse unterzogen.

Die differentielle Expression der interessantesten Gene wurde mittels Real-time RT-PCR verifiziert. Zur Analyse der Daten wurde die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode herangezogen. Dabei diente

Ubiquitin als endogene Kontrolle, die Mock-Varianten der jeweiligen Zeitpunkte wurden zur Kalibration verwendet.

Die Fluoreszenzmikroskopie der infizierten Ähren zeigte Unterschiede zwischen den resistenten und anfälligen Genotypen. Während die infizierten Ährchen der anfälligen Genotypen einen vergleichbar starken Befall aufweisen, ist die Rachis der resistenten Genotypen fünf bis sieben Tage nach der Infektion weniger stark befallen.

In der GeneChip Analyse wurden insgesamt 3175 Gene bzw. ESTs differentiell exprimiert. In Übereinstimmung mit einer parallel durchgeführten cDNA-AFLP Analyse (LfL Freising) fallen hierbei vier WIR1 (*wheat induced resistance*) Gene besonders auf, deren Expression bei dem resistenten Elter Dream 72 Stunden nach der Infektion hoch reguliert ist. Ein WIR1 Protein wurde zuerst in Weizen nach Infektion mit Echtem Mehltau (*Blumeria graminis*) beschrieben (BULL et al. 1992).

Die Hochregulierung der WIR1 Gene konnte durch quantitative RT-PCR bestätigt werden. Differentiell exprimierte Kandidatengene, wie WIR1, können in bestehende Kartierungspopulationen (HOLZAPFEL et al. 2008, SCHMOLKE et al. 2008) integriert werden, um eine mögliche Korrelation mit bereits kartierten QTL für *Fusarium*-Resistenz zu identifizieren und so den Einfluss der Kandidatengene auf die *Fusarium*-Resistenz aufzuklären.

Literatur

- BULL, J., F. MAUCH, C. HERTIG, G. REBMANN and R. DUDLER, 1992: Molecular Plant-Microbe interaction. 5: 516-519.
- HOLZAPFEL, S., H.-H. VOSS, T. MIEDANER, V. KORZUM, J. HÄBERLE, G. SCHWEIZER, V. MOHLER, G. ZIMMERMANN and L. HARTL, 2008: Theor Appl Genet. 117: 1119-1128.
- SCHMOLKE, M., G. ZIMMERMANN, G. SCHWEIZER, T. MIEDANER, V. KORZUM, E. EBMEYER and L. HARTL, 2008: Plant Breeding. 127: 459-464.

¹ Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, IFZ, Justus-Liebig-Universität Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 GIESSEN

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

* Ansprechpartner: Markus RIEHL, markus.rhiel@agr.uni-giessen.de

Selektion auf Frosttoleranz von Winterackerbohnen: Methodenoptimierung

Franziska Schrader^{1*}, Regina Martsch¹ und Wolfgang Link¹

Einleitung

Die Phänotypisierung der Frosthärte von Winterackerbohnen erfolgt in Göttingen nach der von ARBAOUI et al. (2008) entwickelten Methode. Hierbei werden Winterackerbohnen mehrfach kontrolliertem Frost ausgesetzt und anschließend auf Farbe und Turgenzverlust bonitiert. Die Versuche enden mit frostnaher Bonitur der Pflanzen. Diese Methode soll durch Veränderung der Temperaturprofile, Einsatz von Topfisolierung und Untersuchung des Wiederaufwuchses der mehrfach gefrostenen Winterackerbohnen weiter optimiert werden. Der Wiederaufwuchs der Pflanzen soll erfasst werden, um aussagekräftigere Ergebnisse hinsichtlich der Frosttoleranz der Winterackerbohnen zu erhalten.

Material und Methoden

In einer Pflanzenwachskammer (Vötsch) wurden Frostexperimente durchgeführt, um die Frosttoleranz von 36 Winterackerbohnenotypen (Göttinger Material) zu evaluieren und dabei die Methode von Arbaoui zu optimieren. Die Versuchsanlage war eine 4x9 Gitteranlage mit drei Wiederholungen. Bei jedem der beiden Durchgänge wurden zwei Varianten (A, B) angelegt. Winterackerbohnen der Variante A waren in unisolierten Töpfen und wurden einmal einer Temperatur von -13°C ausgesetzt. In Variante B waren die Töpfe mit Styropor isoliert. Die Pflanzen wurden zwei aufeinander folgenden Nächten bei -13°C und -15.5°C gefroren (*Abbildung 1*). Alle Töpfe enthielten ein Sand-Komposterde-Gemisch (1:3) bei einer

Wasserhaltekapazität von 70%. Die Härtung der Pflanzen beider Varianten erfolgte ab dem Zweiblattstadium 11 Tage lang. Am Ende der Härtungsphase wurden die Pflanzen auf Wuchshöhe bonitiert und die Anzahl der Laubblätter bestimmt. Je acht Stunden nach Frostende erfolgte eine Bonitur der Frostmerkmale Turgenzverlust und Farbe der Blätter analog zur Methode von Arbaoui. Je fünf Tage nach dem letzten Frost wurden diese Bonituren erneut durchgeführt und die Pflanzen oberhalb der zweiten Blattachsel zur Frischmassebestimmung abgeschnitten. 28 Tage nach dem Schnitt erfolgte die Schlussernte mit Bestimmung des Wiederaufwuchses.

Ergebnisse

Versuchsvariante A zeigt, dass ohne Topfisolierung bei keinem der Winterackerbohnenotypen nach der ersten Froststufe von -13°C ein Wiederaufwuchs stattfindet. Hingegen gibt es mit Isolierung der Töpfe (Variante B) nach -13°C und -15.5°C Frost Differenzierung. Aus *Tabelle 1* ist ersichtlich, dass die bonitierten Merkmale der Pflanzenmorphologie mit dem Turgenzverlust ab der zweiten Froststufe korrelieren. Letzterer ist allerdings nur leicht negativ mit Wiederaufwuchs korreliert (*Tabelle 1*). Somit stellt der Turgenzverlust kein taugliches Merkmal für Frosttoleranz und Überleben von Winterackerbohnen nach Frostversuchen in der Frostkammer dar. Die Überlebensrate und der Wiederaufwuchs der Winterackerbohnen in Variante B sind signifikant mit $r = 0,62$ korreliert (*Tabelle 1*).

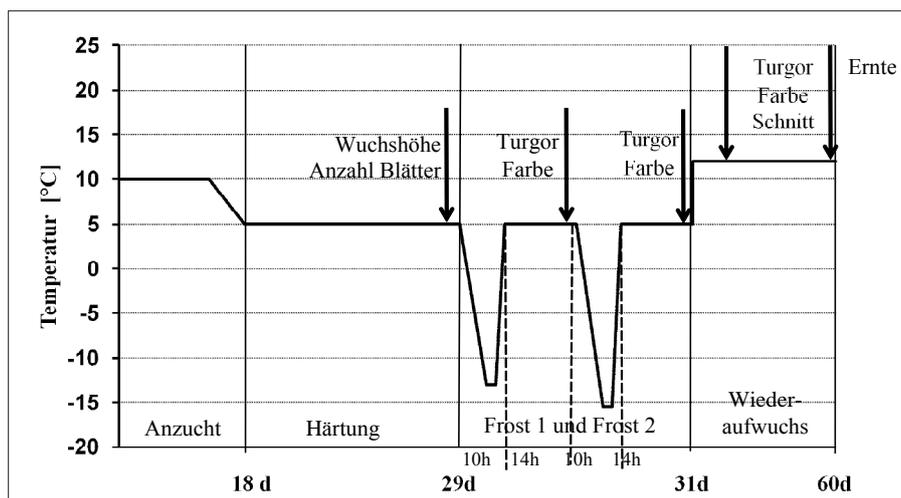


Abbildung 1: Temperaturverlauf und Bonituren, Schnitt und Ernte der Frostversuche mit Winterackerbohnen, Variante B.

¹ Universität Göttingen, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Pflanzzüchtung und Pflanzenbau, Von-Siebold-Straße 8, D-37075 GÖTTINGEN

* Ansprechpartner: M.Sc.agr. Franziska SCHRADER, franziska.schrader@arg.uni-goettingen.de

Tabelle 1: Korrelationskoeffizient (Spearman) zwischen Morphologie, Turgeszenzverlust (T.), Wiederaufwuchs und Überlebensrate in Variante B.

	Wuchshöhe	Blattanzahl	Blattgröße ¹	-13°C	Turgeszenzverlust -15.5°C	Schnitt	Wiederaufwuchs
Blattanzahl	-0.20						
Blattgröße ¹	0.03	0.15					
T. -13°C	0.20	0.17	0.54**				
T. -15.5°C	0.32	0.36*	0.41*	0.60**			
T. Schnitt	0.49**	0.03	0.29	0.25	0.68**		
Wiederaufwuchs	-0.05	0.08	-0.10	-0.12	-0.23	-0.34*	
Überlebensrate	-0.32	-0.5	-0.01	-0.16	-0.36*	-0.56**	0.62**

*, ** Signifikanzniveau 0.05 und 0.01

¹ Bonitur der Blattgrößen wurde in einem weiteren Versuch im Folienhaus durchgeführt.

Ausblick

Die eng an die von M. ARBAOUI etablierte Methode angelehnte Variante A (ohne Topfisolierung) soll in folgenden Versuchen durch Variante B mit Topfisolierung ersetzt werden, um auch bei niedrigeren Frostgraden besser Differenzierung der überlebenden Winterackerbohnen genotypen zu erreichen. Desweiteren soll die Temperatur der zweiten Froststufe auf -17.5 °C erniedrigt werden. Hierdurch wird

eine bessere Aussagekraft der Wiederaufwuchsergebnisse erwartet und eine bessere Selektion der frosttolerantesten Winterackerbohnen genotypen möglich.

Literatur

ARBAOUI, M., C. BALKO and W. LINK, 2008: Study of faba bean (*Vicia faba* L.) winter-hardiness and development of screening methods. Field Crops Research, 106, 60-67.

Barley Yellow Dwarf Virus detection and assessment of virus spread in susceptible and resistant barley plants

Viola Spamer^{1*}, Christian Obermeier¹ and Wolfgang Friedt¹

Abstract

Virus titers in different plant parts from controlled transmission studies between susceptible and resistant plants are compared to understand the mechanisms underlying the reduction of virus replication/spread in resistant plants and characterize and potentially differentiate between distinct mechanisms of BYDV resistance or tolerance.

Keywords: Barley yellow dwarf virus, aphids, barley, PCR, titer

The aphid transmitted *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) causes stunting, reduced root growth and yellowing or reddening of leaves of barley plants and affects to a number of yield parameters. It is one of the major diseases of barley resulting in substantial yield losses worldwide.

This is aggravated by complex detection methods in aphids and insufficient knowledge about tolerance or resistance to the virus and/or aphids in barley. Up to now only three virus-resistance genes were described. Additionally quantitative trait loci (QTL) have been identified and mapped in two different DH-populations originating from the cultivar 'Post' [1].

For identifying resistance genes and/or QTL, which are responsible for an early and/or systemic response to virus infection, it is necessary to detect the replication and movement of the virus during the early infection phase in plants.

A simplified RNA extraction method and BYDV-specific PCR was established for subsequent BYDV detection in single aphids of the species *Ropalosiphum padi*. Barley plants were grown under controlled growth chamber conditions for 3 varieties, Post, Rubina and Vixen, representing different resistance sources. A total number of 270 plants for every variety were inoculated at one-leaf stage with 3 viruliferous aphids each and 3 whole plants were sampled and dissected into leaves, roots and stems every 12 hours up to day 9 after inoculation or every day up to 21 days after inoculation and stored at -20°C. Virus titers of infected leave tissue of different age gathered from three barley varieties with differential resistance will be analyzed by real time RT-PCR. The results will be compared among the varieties and different ages. Data of infected root tissue derived from the same plants will be included in the final analysis also.

Establishment of a sensitive real-time RT-PCR method for BYDV should allow to monitor replication and virus spread within different tissues, organs and developmental stages. This will enable us to compare virus titers in different plant parts in controlled transmission studies between susceptible and resistant plants to understand the mechanisms underlying the reduction of virus replication/spread in resistant plants and characterize and potentially differentiate between distinct mechanisms of BYDV resistance or tolerance.

References

- [1] SCHEURER, K., W. FRIEDT, W. HUTH, R. WAUGH and F. ORDON, 2001: Theor. Appl. Genet. 103:1047-1083.

¹ Department of Plant Breeding, IFZ Research Center for Biosystems, Land Use and Nutrition, Justus-Liebig-University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 GIESSEN

* Ansprechpartner: Viola SPAMER, viola.spamer@bio.uni-giessen.de

Correlation between maize genotypes and the stalk rot caused by maize *Fusarium*

Csaba Szőke^{1*}, János Pintér¹ and Csaba L. Marton¹

Introduction

The stalk strength of maize is of vital importance for the success of maize production. Stalk strength depends on two factors: the mechanical structure and the occurrence of stalk rot caused by various *Fusarium* and *Macrophomina* species. When attacked by these species the stalk tissues are destroyed by the cell-wall decomposing enzymes of the fungi (SZÉCSI 1975, LORENZO et al. 1997, SZŐKE et al. 2006). Substantial differences in resistance to fusarium stalk rot have been observed in various maize hybrids and inbred lines (JUGENHEIMER 1940, MESTERHÁZY 1981, KOVÁCS et al. 1988, LEDENCAN et al. 2003).

This paper discusses the major role of *Fusarium* species in the damage caused by stalk rot in maize.

Keywords: maize, stalk rot, *Fusarium graminearum*, resistance

Material and methods

Six SC hybrids and their twelve parental lines were inoculated with *Fusarium graminearum* isolate (FG36) in 2005 and 2006. This isolate was chosen after preliminary pathogeneity tests on ten different *F. graminearum* isolates. The collection and processing of the samples was begun on October 29th. One severely infected and one slightly

infected hybrid were chosen and stalk tissue extracts were prepared from naturally infected and artificially inoculated samples. These were used to measure the activity of the CMC-ase enzyme using a modified version of the method reported by Dingle.

Results

The results indicated that the genotype and the level of infection had the greatest effect on the investigated traits in the two experimental years. Stalk infection was more severe in 2005, probably due to the weather conditions during flowering and harvesting. The relative values of infection after artificial inoculation are illustrated in *Figure 1*, averaged over the six hybrids and twelve parental lines. Six of the lines exhibited above-average infection. Two of these (C, G) were used as the female parent in the hybrids, while the other four (B, D, H, L) were male components. Among the female components, lines A and K exhibited the least infection. Among the hybrids, two genotypes (MV2 and MV4) had an above-average level of infection.

Both of these hybrids involved female components that became severely infected. Although line L had a substantially higher value of infection than the average of the lines (being the most severely infected of the male lines), hybrid MV6 had the second smallest negative deviation from the hybrid mean. In hybrids MV1 and MV3, which exhibited

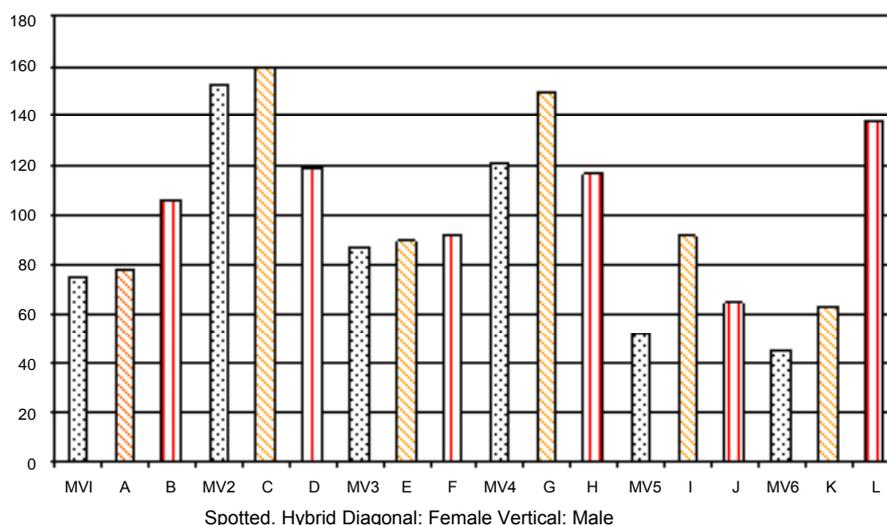


Figure 1: Level of *Fusarium* stalk infection relative to the experimental mean (100%) for the hybrids and their female and male parental lines

¹ Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Brunszvik Street 2, H-2462 MARTONVÁSÁR

* Contact: M.Sc. Csaba SZŐKE, szoekes@mail.mgki.hu

below-average infection, the female component suffered less severe infection than the male component. The lowest level of infection was recorded for hybrid MV5, which was the only hybrid where the female component was more heavily infected than the male. The relative values of artificial infection for the female and male parents and for the hybrids were used to calculate correlation coefficients between the female and male parents and the hybrids. The female parent-hybrid correlation coefficient was found to be $r = 0.88$, while the male parent-hybrid correlation coefficient was $r = 0.39$. Similar values were reported by Georgiev (1977) and MARTON (2002). These results suggest that the inheritance of resistance to *Fusarium* stalk rot is more closely correlated with the resistance of the female component.

The CMC-ase enzyme activity measurements gave the following results: in the case of the MV7 hybrid, which was least infected in the field, the enzyme activity of the tissue extract was lower than that of MV2, the hybrid that was damaged to the greatest extent by the *Fusarium graminearum* isolate in the field and which had significantly higher enzyme activity (Figure 2). This suggests that isolates with greater cellulase activity are more aggressive cell-wall decomposers, and that there is a correlation between the cellulase activity of the isolates and their aggressiveness. This will be clarified in further experiments.

References

- GEORGIEV, T., 1977: Relationship between stalk strength and grain yield of normal and endosperm mutant hybrids of maize. IX. Meeting of Eucarpia Maize and Sorghum Section. Krasnodar, USSR, August 7-13, 1977. Abstracts of Papers, 3, 73-74.
- JUGENHEIMER, R. W., 1940: Resistance to Diplodia infection in inbred lines and hybrids of maize. PhD Thesis, Iowa State College, 94 p.
- KOVÁCS, G., Á. MESTERHÁZY, A. KOROM, 1988: Kukoricahibridek cső-szárufuzáriummal szembeni ellenállósága és mechanikai szilárdsága. (Resistance of corn hybrids to fusarial stalk and ear rots and their mechanical stalk characteristics.) Növénytermelés, 37, 1-12.
- LORENZO, G. De, R. CARTORIA, D. BELLINCAMPI and F. CERVONE, 1997: The Mycota V. Part A. In: CARROL, G. C., TUD-

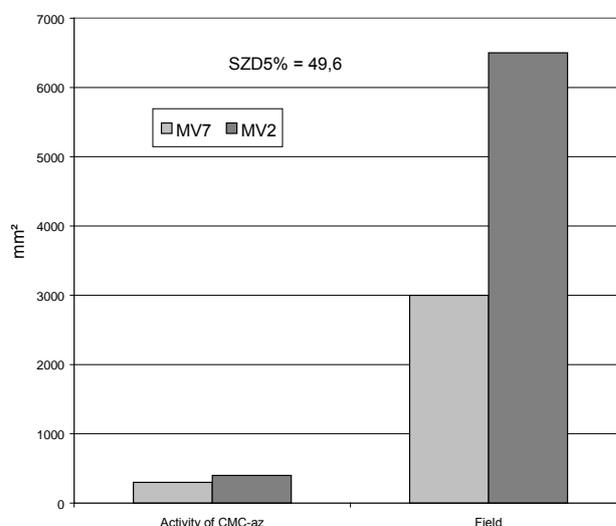


Figure 2: CMC-ase enzyme activity of the isolates and the area of the lesion developing in the stalk as the result of field infection (MARTONVÁSÁR 2006)

- ZYNSKI, P. (eds.), Plant Relationships. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.
- MARTON, L.C., 2002: Kukoricahibridek termése, tenyészideje és szárszilárdsága. (Yield, vegetation period and stalk strength of maize hybrids.) DSc Thesis. MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár, pp. 19-20.
- MESTERHÁZY, Á., 1981: A kukorica kéregellenállásának és szárkorhadással szembeni rezisztenciájának kapcsolata. (Relationship of bark resistance and resistance to nigrospora cob rot in maize.) Növénytermelés, 30, 309-318.
- SZÉCSI, Á., 1975: Sejtfallbontó enzimek szerepe a kukorica *Fusarium* okozta szárkorhadásában. (Role of cell-wall degrading enzymes in fusarium stalk rot of corn.) A Növényvédelmi Kutató Intézet Évkönyve, 13, 227-241.
- SZŐKE, C., Z. HEGYI, J. PINTÉR, L.C. MARTON and Á. SZÉCSI, 2006: Correlation between stalk rot caused by maize *Fusarium* and the level of cellulase activity. XXth International Conference of the Eucarpia Maize and Sorghum Section, 20-24 June 2006, Budapest, Hungary.

Sortenabhängige und zeitliche Entwicklung von Fruchtfäule bei Ölkürbis (*C. pepo* var. *styriaca*)

Johanna Winkler^{1*}, Bianca Freistetter² und Herbert Huss³

Zusammenfassung

Die Sorte „Gleisdorfer Diamant“ zeigt in der Phase der Fruchtreife ein deutlich verlangsamtes Fortschreiten der Fruchtfäulnis gegenüber der Sorte „Gleisdorfer Ölkürbis“. Dies ermöglicht ein längeres Zuwarten der Ernte bis zur optimalen Ausbildung der Kerne, wodurch auch eine hohe Ölqualität gewährleistet wird. Fruchtfäulnisschaden trat unabhängig vom Alter der Früchte auf. Die in der mehrwöchigen Blühperiode zuerst angesetzten Früchte wiesen bei beiden Sorten wenig Fruchtfäulnis auf. Bei der fäulnistoleranten Sorte „Gleisdorfer Diamant“ faulten die mittel- und spät angesetzten Früchte weniger stark als beim „Gleisdorfer Ölkürbis“.

Verursacht wurde die Fruchtfäule im Jahr 2008 von dem Pilz *Didymella bryoniae* und dem Bakterium *Erwinia carotovora*.

Schlagwörter: Oil pumpkin, tolerance to fruit rot, *Didymella bryoniae*, Gleisdorfer Ölkürbis, Gleisdorfer Diamant

Abstract

The oil pumpkin variety „Gleisdorfer Diamant“ shows during the period of fruit ripening a very reduced increase of fruit rot compared with the variety „Gleisdorfer Ölkürbis“. This enables to harvest when the seeds are fully filled without having reduced seed yields.

During the maturing period there was no relationship between fruit rot and the age of fruits. The early fruit set in the about 4 weeks lasting period of fruit set had been less affected by fruit rot at both varieties. The tolerant variety “Gleisdorfer Diamant” showed less fruit rot with respect to medium and late fruit set.

Fruit rot was mainly caused by the fungus *Didymella bryoniae*, accompanied by the bacterium *Erwinia carotovora*.

Keywords: Oil pumpkin, tolerance to fruit rot, *Didymella bryoniae*, Gleisdorfer Ölkürbis, Gleisdorfer Diamant

Hintergrund

Der Steirische Ölkürbis (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) mit seinen weichschaligen dunkelgrünen Samen gewinnt zunehmend kulinarisch und wirtschaftlich an Bedeutung. In den letzten Jahren ist allerdings auch ein verstärktes Krankheitsauftreten zu beobachten. Die größten Probleme verursacht dabei eine von dem Pilz *Didymella bryoniae* verursachte Fruchtfäule (HUSS et al. 2007). Im heurigen Jahr war auch eine Beteiligung des Bakteriums *Erwinia carotovora* an der Fäulnisbildung nachweisbar.

In den Jahren 2006 bis 2008 betrug der fäulnisbedingte Ertragsausfall bei der anfälligen Hauptsorte „Gleisdorfer Ölkürbis“ 15,5 % (GREIMEL, 2008a).

Tabelle 1: Prozentuelle Fruchtfäulnis in Praxisversuchen

Quelle: GREIMEL, 2008a, Arbeitskreis Ackerbau, Landwirtschaftskammer Steiermark

Jahr	Sorte		Anzahl Versuche
	Gleisdorfer Ölk.	Gl. Diamant	
2006	16,0	10,0	7
2007	10,0	4,0	7
2008	20,5	14,4	6
Ø	15,5	9,5	

Die Ölkürbissorte „Gleisdorfer Diamant“ erwies sich hingegen als tolerant gegen Fruchtfäule (GREIMEL, 2008b). Auf diese Toleranz wurde nicht gezielt selektiert. Um zu eruieren, ob diese Toleranz auf ein bestimmtes Blüh- und Fruchtansatzverhalten zurückzuführen ist, wurden im Jahr 2008 umfassende Beobachtungen während der mehrwöchigen Blühperiode hinsichtlich des Fruchtansatzes und des zeitlichen Auftretens der Fruchtfäule bei diesen beiden Sorten durchgeführt.

Material und Methode

Inmitten des Praxisversuchsfeldes der Steirischen Landwirtschaftskammer am Standort St. Ruprecht/Raab im Jahr 2008 wurden je 3 Parzellen in der Größe von 16,8 m² (4,2 x 4 m) als Beobachtungseinheiten bei den Sorten Gleisdorfer Ölkürbis (GL) und Gleisdorfer Diamant (D) markiert. Ab Blühbeginn (23.6.) bis Ende der Hauptblüte (16.7.) wurden täglich alle weiblichen Blüten mit Schlaufenetiketten versehen, wobei das Blühdatum notiert wurde. Am 7. August erfolgte bereits die erste Auszählung der gefaulten Früchte, weitere 3 Auszählungstermine folgten (18. 8., 26.8. und 2.9.). Bei der letzten Auszählung war der Bestand bereits erntereif.

¹ Saatzeit Gleisdorf, Am Tieberhof 33, A-8200 GLEISDORF

² LFZ Raumberg-Gumpenstein, Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Raumberg 38, A-8952 IRDNING

³ LFZ Raumberg-Gumpenstein, Institut für Biologische Landwirtschaft, Versuchsstation Lambach/Stadl-Paura, Gmundnerstr. 9, A-4651 STADL-PAURA

* Ansprechpartner: Dipl.-Ing. Johanna WINKLER, winkler.szgleisdorf@utanet.at

Ergebnisse

Bei beiden Sorten setzte nur ein Drittel der weiblichen Blüten Früchte an. Bereits 84 % der Früchte wurden im Zeitraum 23. 6. bis 13.7. angelegt.

Die Sorte „Gleisdorfer Diamant“ (D) bildete je Parzelle deutlich mehr Früchte aus als „Gleisdorfer Ölkürbis“ (GL), nämlich 37 versus 26. Davon verfaulten durchschnittlich je Parzelle bei D 6 und bei GL 7 Früchte. Dies ergibt 15,5 % Fruchtfäulnis bei D und aufgrund der deutlich geringeren Gesamtfruchtzahl 27,8 % Fruchtfäulnis bei GL.

Die untersuchten Sorten zeigten eine unterschiedliche zeitliche Entwicklung der Fruchtfäulnis. Bei der ersten Fruchtzählung am 7. August waren bei D 6 % und bei GL 5 % der Früchte mit starken Fäulnissymptomen zu beobachten. Bis 18. August war bei D die weitere Fäulnisentwicklung allerdings deutlich geringer als bei GL (plus 1,8 % bzw. plus 5,0 %). Die Fäulniszunahme driftete bei den 2 weiteren Beobachtungsterminen (26. August und 2. September) zuungunsten der Sorte GL noch stärker auseinander (weitere plus 7,2 % bzw. 17,7 % Fruchtfäulnis).

Bei Gleisdorfer Ölkürbis begann die Fruchtfäulnis tendenziell bei den früh angelegten Früchten und betraf letztlich massiv die nach der Hauptblüte angelegten Früchte. Bei Gleisdorfer Diamant mit der deutlich geringeren Anzahl gefaulter Früchte war der Fäulniseintritt in keinem Zusammenhang mit dem Alter der Früchte.

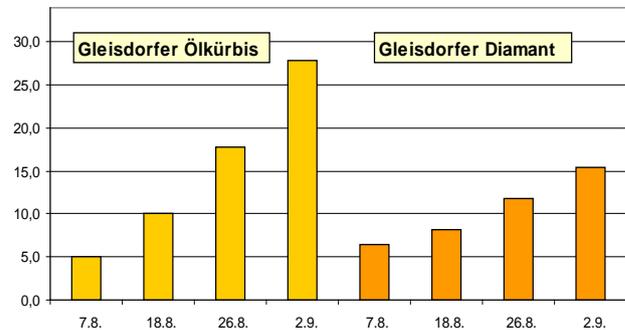


Abbildung 1: Zeitliche Zunahme der prozentuellen Fruchtfäulnis in Relation zur Gesamtfruchtzahl

Literatur

- GREIMEL, C., 2008a: Persönliche Mitteilung.
- GREIMEL, C., 2008b: Ölkürbis: Populationsorten oder Hybridsorten? Der Fortschrittliche Landwirt, 6/2008, 30-31.
- HUSS, H., J. WINKLER und C. GREIMEL, 2007: Der Pilz *Didymella bryoniae* schädigt steirischen Ölkürbisanbau: Fruchtfäule statt Kernöl, Der Pflanzenarzt 60 (6-7), 14-16.

Dank

Diese Arbeit wurde im Rahmen des durch die FFG geförderten Projektes Nr. 812110 „Genetisch bedingte Fruchtfäule bei Ölkürbis“ durchgeführt.