

Vereinigung der Pflanzenzüchter
und Saatgutkaufleute Österreichs

59. Tagung

25.-27. November 2008

Abwehrstrategien gegen biotische Schaderreger

Züchtung von Hackfrüchten und Sonderkulturen

Lehr- und Forschungszentrum 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

Für den Inhalt verantwortlich

die Autoren

Redaktion

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

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

Univ.Doz. Dr. Karl Buchgraber
Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein

Layout

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

Druck, Verlag und © 2009

Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft, 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: 0000-0000

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. Chrпова, 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 Frank 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
Felix 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, Silvia Schmidt, Leo 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, A. Weilharter	
Molecular Breeding Research with Sugar Beet	75
Friedrich 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 Wolfgang 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

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. HOLZAPFEL 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 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. dicoccoides*) 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

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

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 of resistance from bread wheat to durum wheat was only partly successful so far.

QTLs 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 QTLs 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 in 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, 2008: QTL mapping and marker assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat - a review. *Plant Breeding* (in press).
- 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 anther 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, 2008: Differential gene expression of related wheat lines with contrasting levels of head blight resistance after *Fusarium graminearum* inoculation. *Theor. Appl. Genet.* in press.
- 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.

Einleitung

Die durch Fusarium-Pilze hervorgerufene partielle Taubährigkeit 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 halbverzwergten (*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 Sprühinokulation 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 aus-

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

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

gewählte Linien in 4 Umwelten nach Sprühhinokulation mit *F. culmorum* geprüft. Eine QTL Meta-Analyse für die 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“

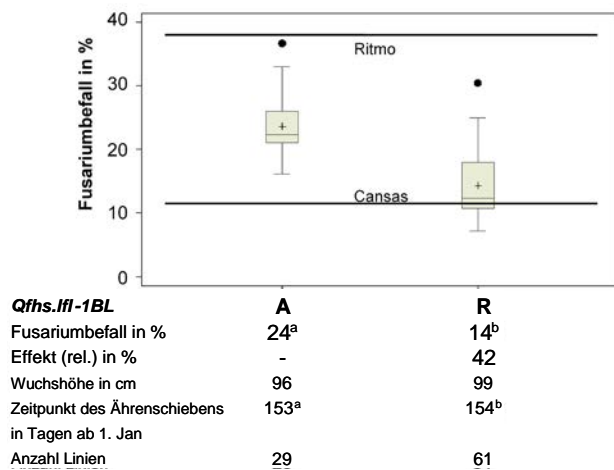


Abbildung 1: Boxplot-Verteilung der für die QTL-Verifikation selektierten 90 Genotypen nach Sprühhinokulation mit *F. culmorum* - aufgeteilt nach den beiden Markerklassen mit dem anfälligen (A) bzw. resistenten (R) Allel von *Qfhs.lfl-1BL*. Die 90 Genotypen gehen zurück auf vier bezüglich *Qfhs.lfl-1BL* 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 ($P < 0,05$).

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

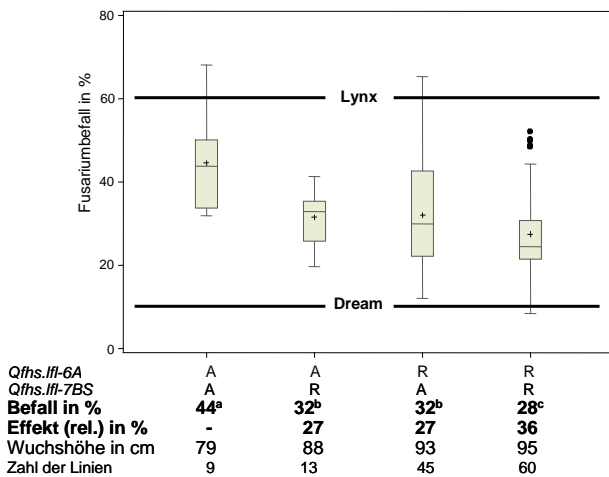


Abbildung 2: Boxplot-Verteilungen der für die QTL-Verifikation erstellten BC₂S_{2,3}-Linien (Dream/Lynx*4) nach Sprühhinokulation mit *F. culmorum* - aufgeteilt nach den vier Markerklassen mit den anfälligen (A) und/oder den resistenten (R) Allelen der QTL *Qfhs.lfl-6AL* und *Qfhs.lfl-7BS*. Die Daten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

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.

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. 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.
- 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, J. 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* DOI 10.1007/s00122-008-0850-z
- 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. EBMEYER 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 program 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. EBMEYER, H. COESTER, H. KEMPF and T. MIEDA-
NER, 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 Versuchs-
flächen 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. LOGO-
THETIS, 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 (ProjektNr. 2386), dem Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz und der
Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflan-
zenzüchtung e. V. (GFP) (ProjektNr. 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

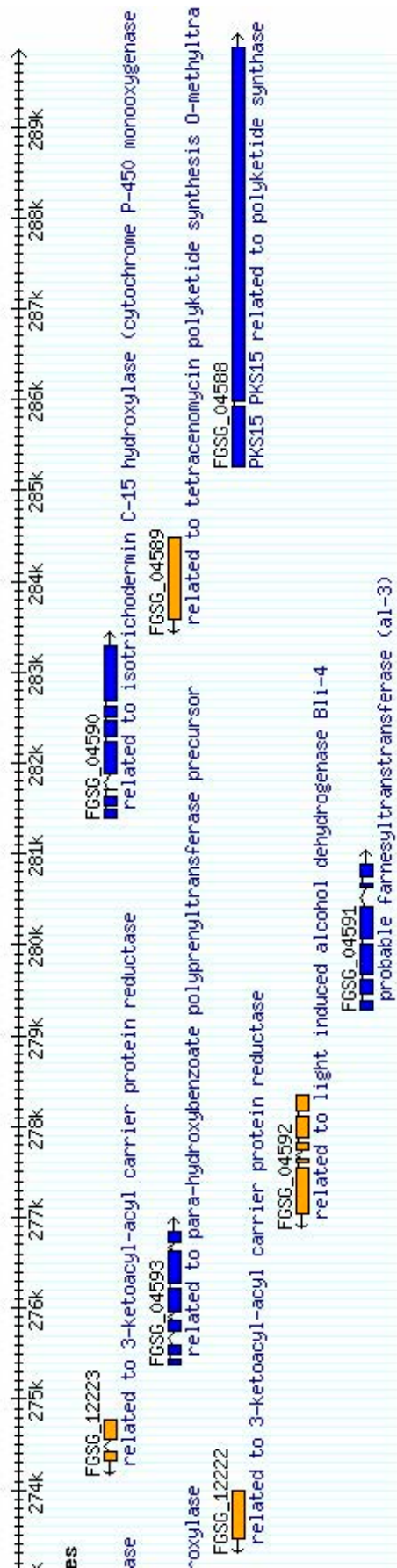


Abbildung 1. In planta induzierter Gencluster um *PKS15* (automatisierte Annotationen laut FGDB)

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

Die Autoren bedanken sich beim österreichischen Genomprogramm GEN-AU und FWF (Spezialforschungsbereich F 37) für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

- BUERSTMAYR, H., T. BAN and J.A. ANDERSON, 2008: QTL mapping and marker assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat - a review. Plant Breeding (in press).
- 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-Kolokalisation, 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

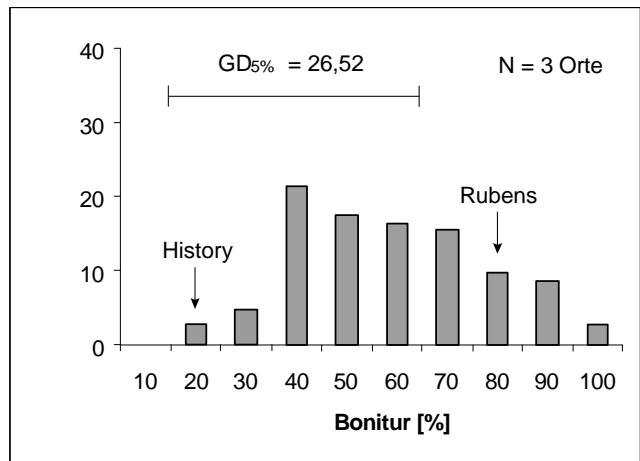
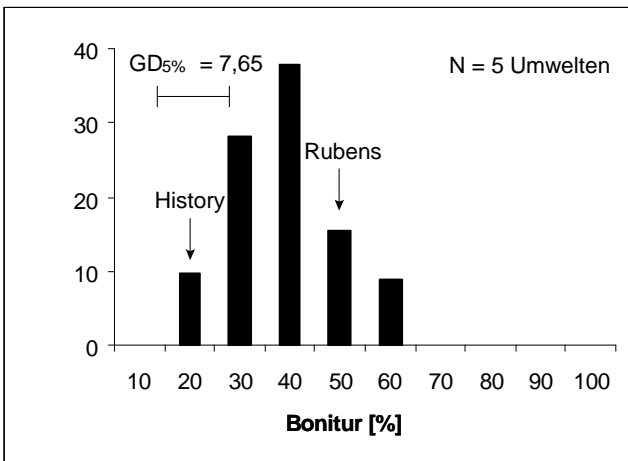


Abbildung 2: Merkmalsverteilung der Weizenpopulation History x Rubens (N=103) für die Resistenz gegen Ährenfusariosen (links) bzw. Blattseptoria (rechts)

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.

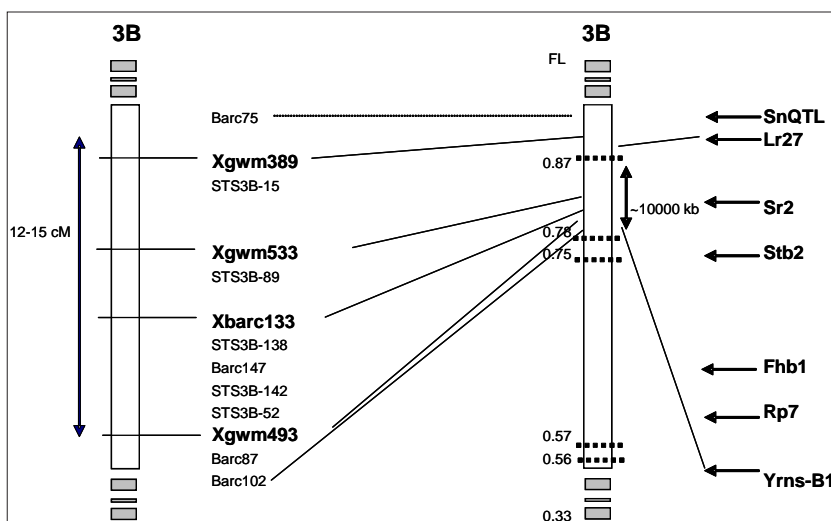


Abbildung 4: Ausschnitt aus der genetischen (links) bzw. physikalischen (rechts) Karte des Weizenchromosoms 3BS mit Angabe der lokalisierten Resistenzgene/QTL

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, 2008: QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding* (in press).
- 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* DOI 10.1007/s11032-008-9250-y (online).
- 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* DOI 10.1007/s10681-008-9832-0 (Online).
- 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-RUZYNĚ

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. RUCKENBAUER, 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. PALAVERŠIĆ und I. IKIĆ, 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.

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-

Einleitung

Fusarium-Taubährigkeit 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.

Keywords:

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

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.

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

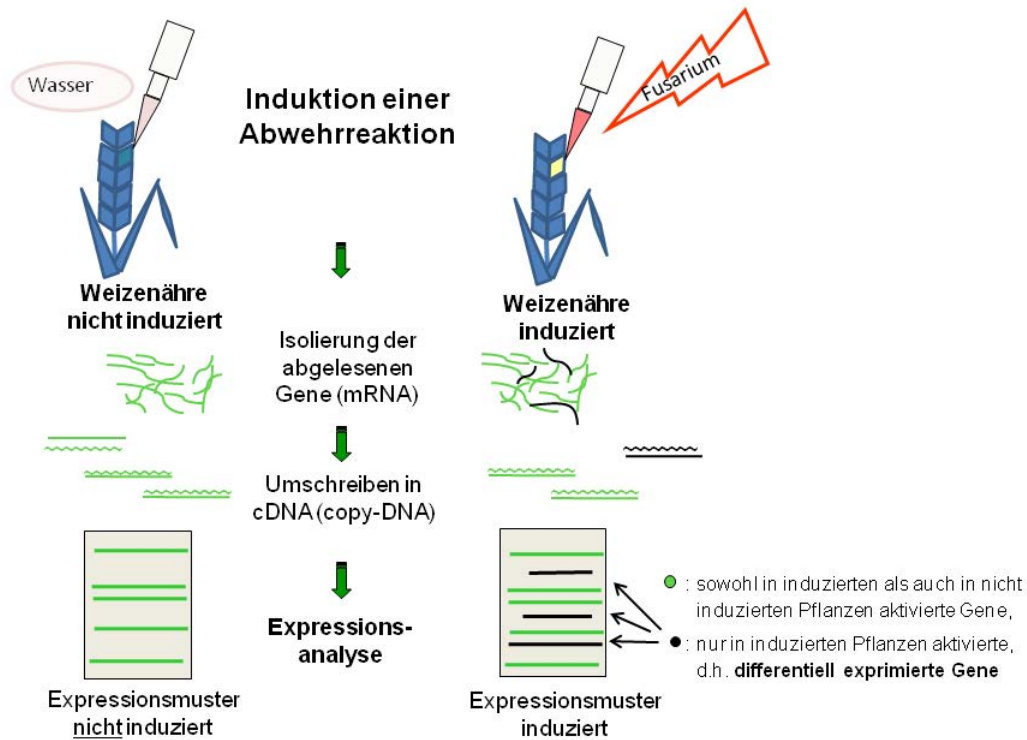


Abbildung 1: Übersicht über den Ansatz der Expressionsanalyse

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 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 differentiiell exprimierten TDFs bekannten Genen mit bekannter Funktion zugeordnet werden, ein Drittel hat unbekannt 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.

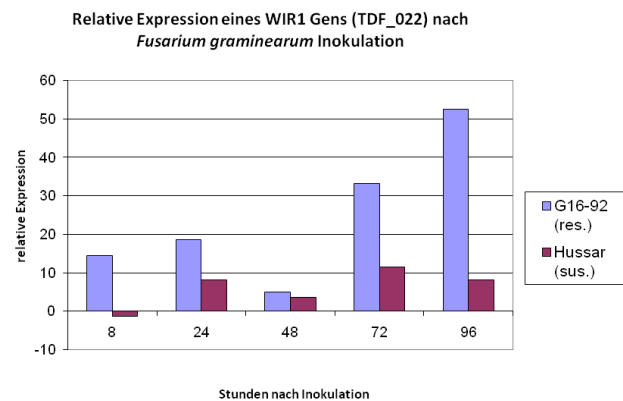


Abbildung 2: Differentielle Expression eines „WIR1“-Gens quantifiziert durch Real-time PCR nach *Fusarium*-Inokulation

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

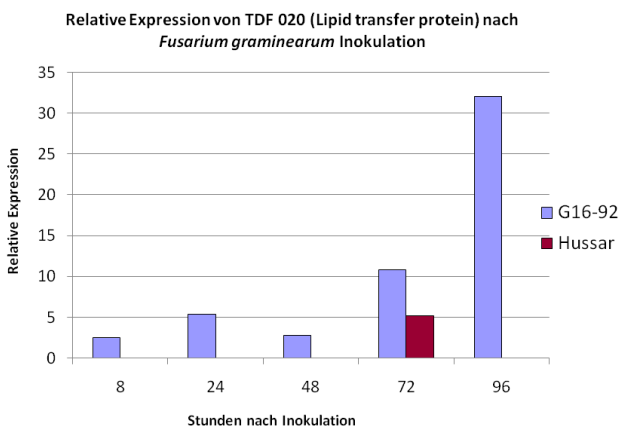


Abbildung 3: Differentielle Expression eines „Lipid transfer Proteins“ quantifiziert durch Real-time PCR nach *Fusarium*-Inokulation

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 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 Genombereichen 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. TROTET, 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* (published online).
- 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* (accepted)

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

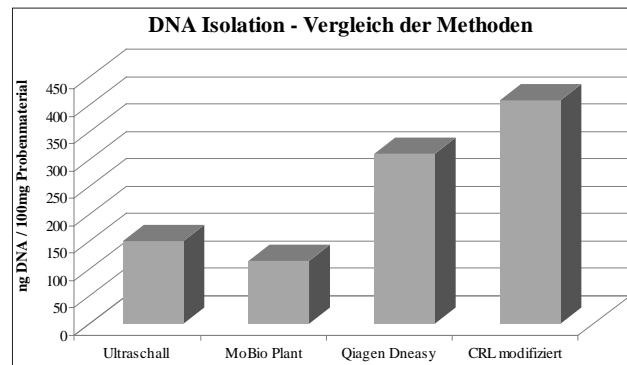
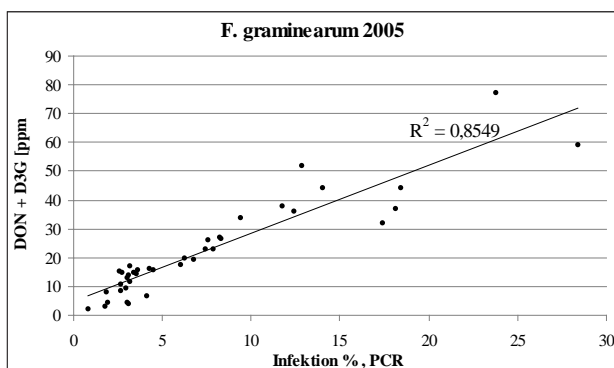


Abbildung 1: Vergleich der DNA Ausbeute einiger etablierter Isolationsmethoden

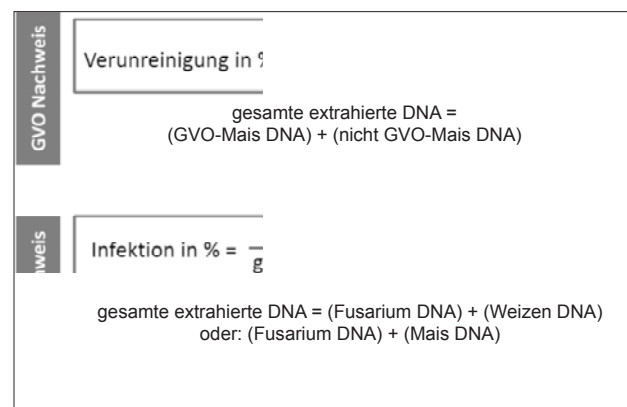


Abbildung 2: Umlegung der etablierten PCR-Methode zum Nachweis von gentechnisch verändertem Mais auf die Bestimmung der Infektion durch *Fusarium*

PCR-bestimmte Infektion verglichen 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

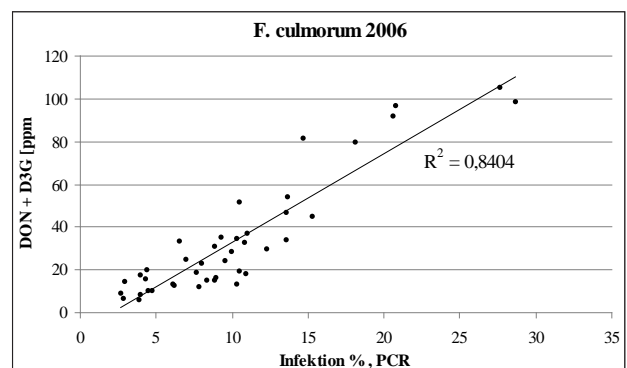


Abbildung 3: Die gebildete Toxinmenge korreliert unabhängig vom Jahr oder eingesetzten Stamm sehr gut mit der nachgewiesenen Menge an *Fusarium*

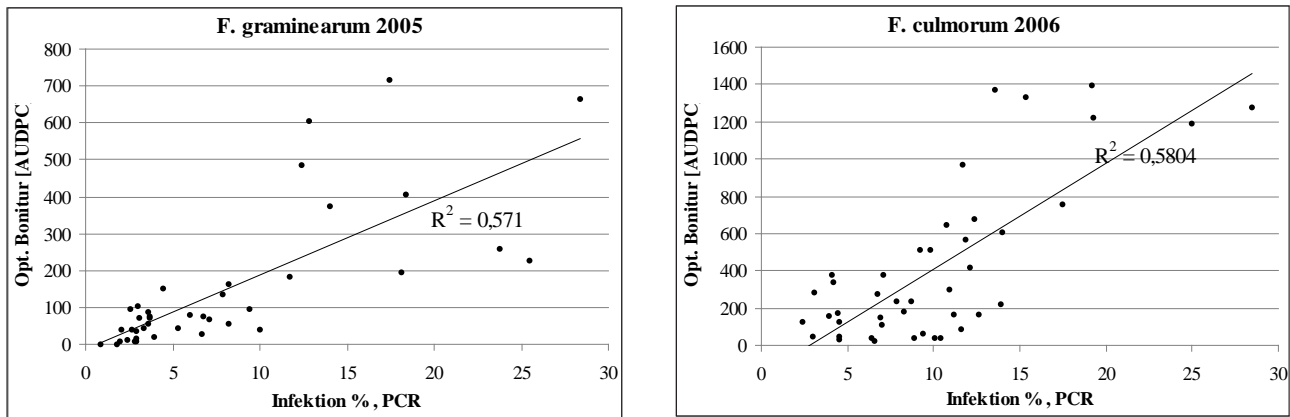


Abbildung 4: Korrelation zwischen visueller Bonitur (AUDPC - Area Under Disease Pressure Curve) und dem PCR bestimmten Infektionsgrad

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.

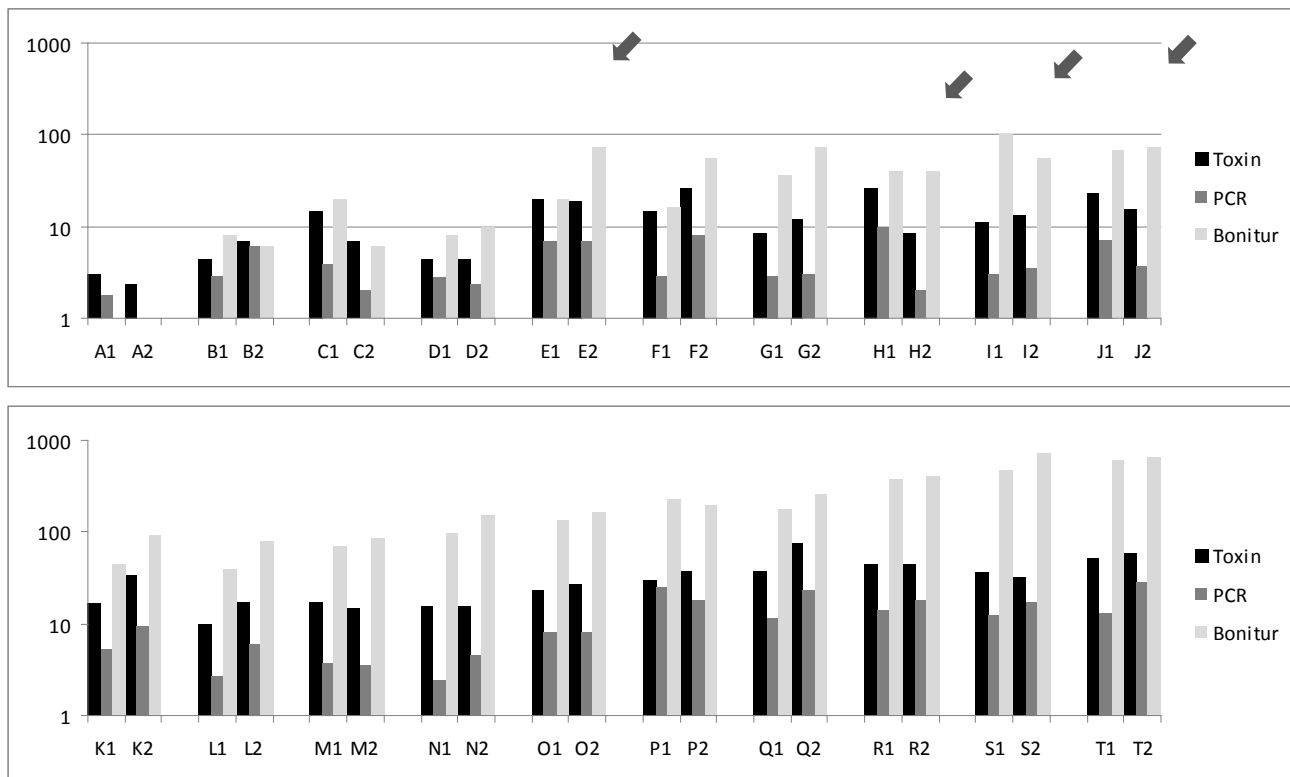


Abbildung 5: Inokulation mit *F. graminearum*. Die Buchstaben markieren die jeweiligen Sorten und ihre Feldwiederholung. A1: Parzelle 1 der Sorte A, A2: Parzelle 2 der Sorte A. Die Y-Achse gibt folgende Einheiten wieder: Toxinmenge [mg/kg], PCR-Methode [Infektions%] und visuelle Bonitur [AUDPC]. Die 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. HIETANIEMI, 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).

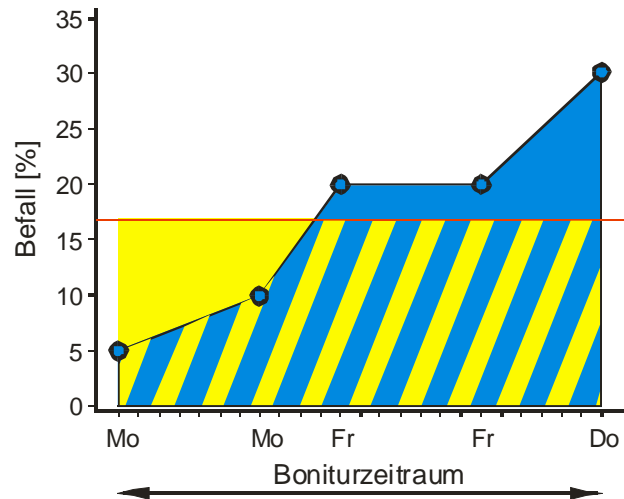


Abbildung 1: Fläche unter der Befallsverlaufskurve

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

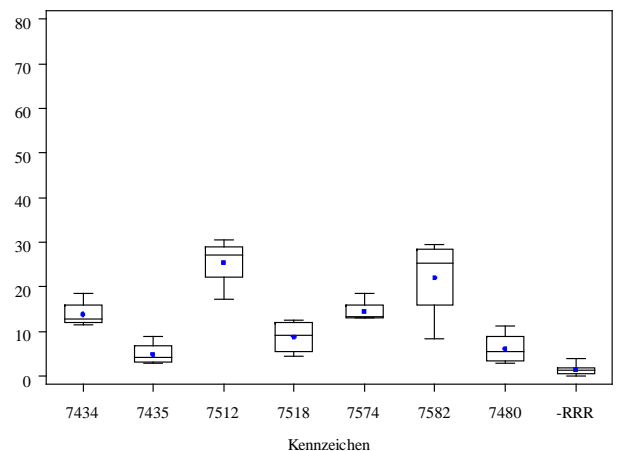
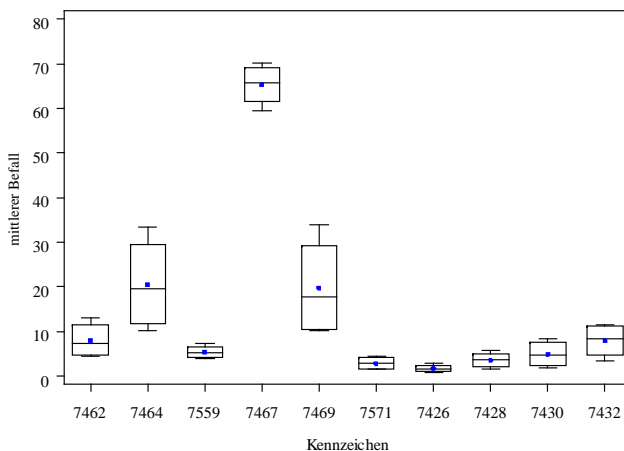


Abbildung 2: Boxplots für die Verteilung des Befalls

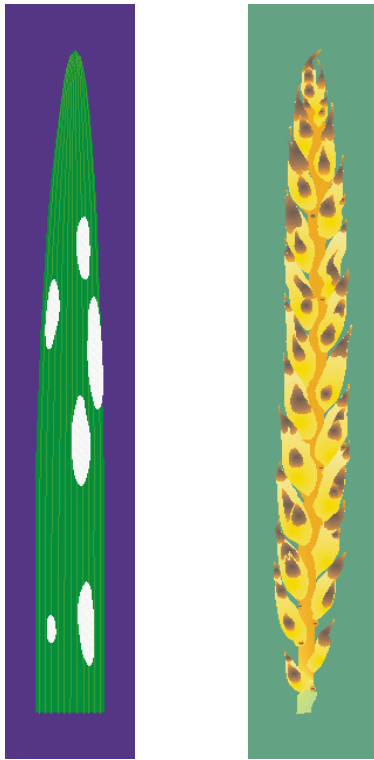


Abbildung 3: Schadbilder für Echter Mehltau der Gerste (l) Stagonospora-Spelzenbräune des Weizens (r)

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. aciformis* (syn. *T. aciformis*, anamorph: *Helgardia aciformis*) (OA). Eine effiziente Strategie zur Reduzierung von Ertragsverlusten ist der Anbau resistenter Sorten. Da die phänotypische Erfassung der Symptome auf dem Feld arbeits- und zeitintensiv ist, stellen molekulare Marker in der Resistenzzüchtung gegen diese Pathogene wertvolle Hilfsmittel dar. Grundlage für die Entwicklung molekularer Marker sind verlässliche phänotypische Daten. Zur Gewinnung dieser Daten wurde eine quantitative Real-time PCR Methode entwickelt, welche basierend auf einer künstlichen Inokulation im Gewächshaus das Pathogen bis zu einer Nachweisgrenze von 0.1 pg detektiert. In einer nachfolgenden Analyse von Feldproben konnte eine hohe signifikante Korrelation zwischen Feldbonitur und den mittels Real-time-PCR gewonnenen Daten für OY nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich in Gewächshausversuchen, dass Genotypen mit verschiedenen Resistenzgenen (*Pch1*, *Pch2*) und anfällige Genotypen eindeutig anhand des Gehaltes an Pathogen-DNA differenziert werden können.

In Analysen zur Entwicklung molekularer Marker für die Resistenzgene *Pch1*, *Pch2* und einer aus *Ae. kotschyi* stammenden Resistenz konnten unter Verwendung der Bulk Segregant Analysis (BSA) mittels SSR und AFLPs zwei AFLP und drei SSR Marker für *Pch1* sowie 5 polymorphe AFLP-Fragmente als potentielle Kandidaten für *Pch2* identifiziert werden. Bisher lieferten jedoch weder molekulare noch zytogenetische 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. aciformis* (syn. *T. aciformis*, anamorph: *Helgardia aciformis*) (OA) are the agents of eyespot. An efficient strategy to reduce yield losses caused by this disease is growing of resistant cultivars. Breeding for resistance to eyespot disease may become more effective by using closely linked markers as symptom scoring in the field is laborious and time consuming. A prerequisite for efficient marker development is the availability of reliable phenotypic data. Therefore, a method for phenotyping DH-populations in the greenhouse by quantitative Real-time-PCR was developed in a first step facilitating a detection of the pathogen up to 0.1 pg.

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

Development of molecular markers is carried out for resistance genes *Pch1*, *Pch2* 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 Bulkend Segregant Analysis (BSA) und 256 AFLP Kombinationen

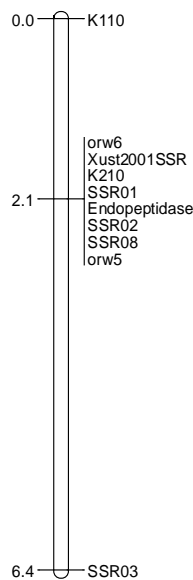


Abbildung 1: Kopplungsgruppe auf Chromosom 7D für die Population BAZ7/10 berechnet mit JoinMap 4.0. Endopeptidase *EpD1b* cosegregiert mit 1 AFLP-Marker (K210) und mehreren SSR-Markern.

(*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.

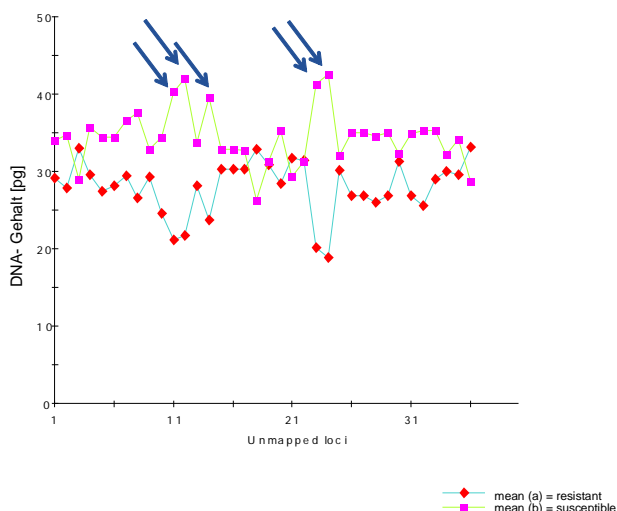


Abbildung 2: Mittelwertvergleich nach Krustal-Wallis für 36 Polymorphismen zwischen anfälligen und resistenten Bulks gegenüber *Oculimacula* spp. 5 AFLP-Fragmente (Pfeil) zeigen hochsignifikante Unterschiede im Mittelwertvergleich.

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*.
- JACKSON, E.W., D.E. OBERT, M. MENZ, G. HU, J.B. AVANT, J. CHONG and J.M. BONMAN, 2007: Characterization and mapping of oat crown rust resistance genes using three assessment methods. *Phytopathology* 97: 1063-1070.
- MAIA, N., 1967: Obtention de blés tendres résistants au piétin-verse par croisements interspécifiques blés x *Aegilops*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Académie de l' Agriculture de France* 53, 149-154.
- MEYER, N., P. KARLOVSKY, M. ZAHN, V. LIND, I. KRÄMER, F. ORDON, 2006: Quantifizierung des Befalls von *Oculimacula aciformis* und *Oculimacula yallundae* als Grundlage zur Entwicklung molekularer Marker für Resistenzgene gegenüber der Halmbruchkrankheit bei *Triticum aestivum*. *Pflanzenzüchtung und Genomanalyse, Bericht über die 57. Pflanzenzüchertagung, 21.-23.11.2006, Gumpenstein, Österreich*, S. 112.
- MIELKE, H., 1995: Studien zum Befall des Weizens mit *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton unter Berücksichtigung der Sorten- und Artenanfälligkeit sowie der Bekämpfung des Erregers. *Mitteil. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, H. 314, 197 S.
- McMILLIN, D.E., R.E. ALLAN and D.E. ROBERTS, 1986: Association of an isozyme locus and strawbreaker foot rot resistance derived from *Aegilops ventricosa* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 72, 743-747.
- De la PEÑA, R.C., T.D. MURRAY and S.S. JONES, 1997: Identification of an RFLP interval containing *Pch2* on chromosome 7AL in wheat. *Genome* 40, 249-252
- THIELE, A., E. SCHUMANN, A. PEIL and W.E. WEBER, 2002: Eyespot resistance in wheat *Aegilops kotschy* backcross lines. *Plant Breeding* 121, 29-35.
- WALSH, K., J. KORIMBOCUS, N. BOOHHAM, 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	Escaldadura	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

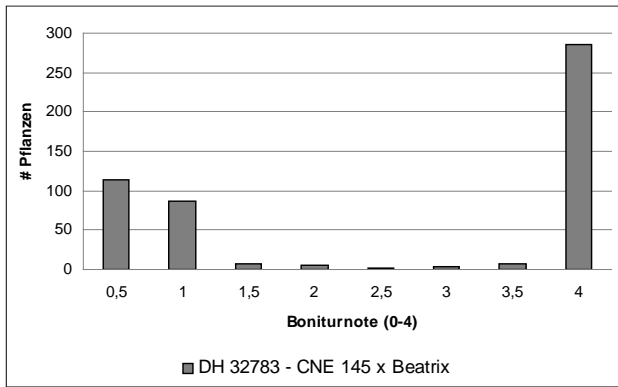


Abbildung 1: Verteilung der Linien der DH-Population 32783 auf die GWH-Boniturnoten

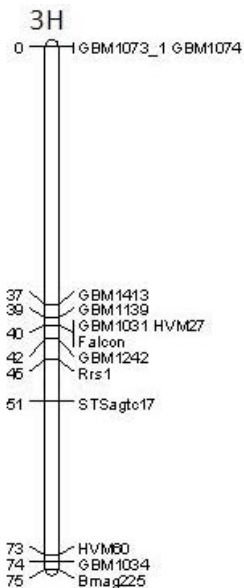


Abbildung 2: Genetische Karte des Centromerbereichs von Chromosom 3 H in der DH 32783

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.*

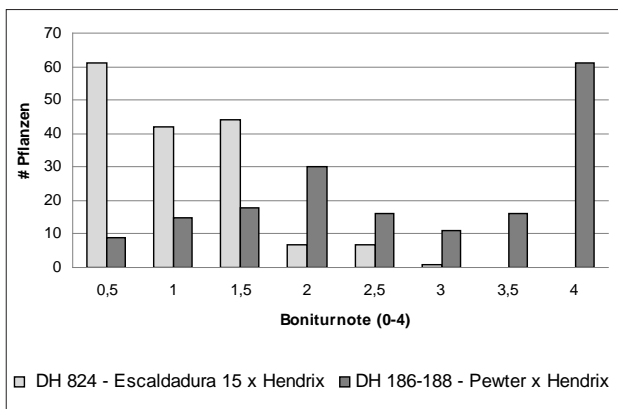


Abbildung 3: Verteilung der Linien der DH-Populationen 824 und 186-188 auf die Boniturnoten

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)

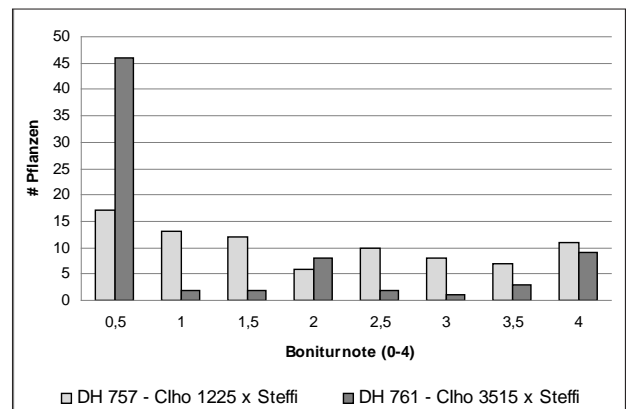


Abbildung 4: Verteilung der Linien der DH-Populationen 757 und 761 auf die Boniturnoten

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

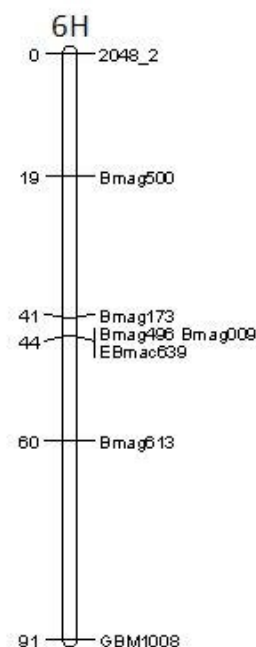


Abbildung 5: Genetische Karte des kurzen Arms von Chromosom 6 H in der DH 761

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 ≤ 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 ≥ 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

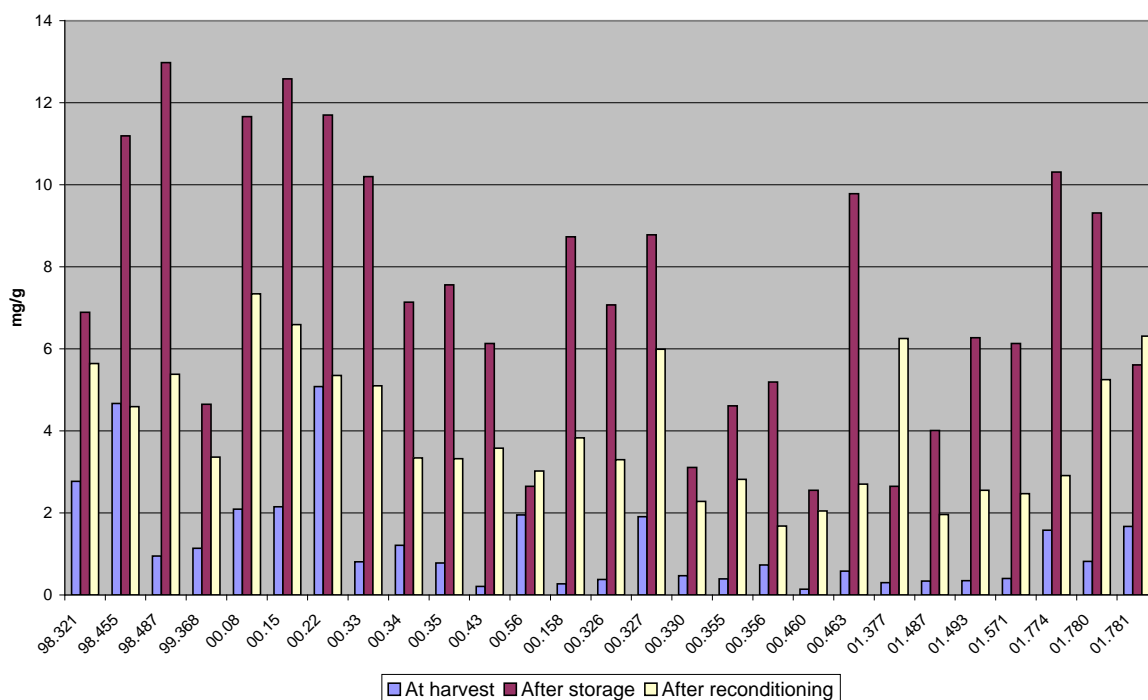


Figure 1: Reducing sugar content of potato breeding lines at different stage of storage

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

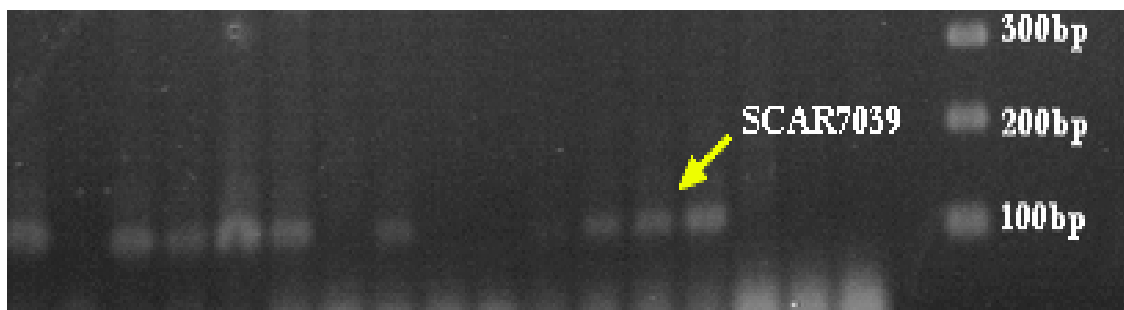


Figure 2: Detection of presence or absence of Rysto gene in 17 potato varieties by SCAR7039 marker

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), pp. 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, pp. 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)
	Nalgern	(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 DOMKÁŘOVÁ¹ 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 Seleka 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.

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 combination with segregation analysis for the entire progeny the characteristics and genetic states of inherent factors

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

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 trialed in the field, at Meires, Waldviertel. In a trial in

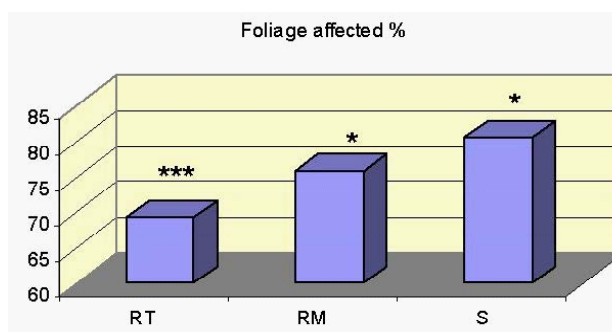


Figure 1: Effect of R phenotype on LB resistance in the field. Field trial 2005, Meires, Austria. Population MF-II x TPS67 80 progeny (30 RT, 30 RM, 20 S) no fungicide, natural infestation, average of 3 disease readings, percent foliage area affected on 10-plant-plot. * = P<0.05, * = P<0.001 (t-test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

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.

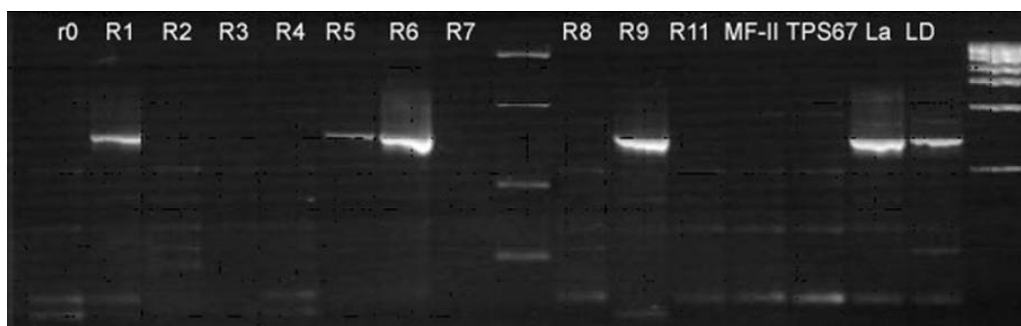


Figure 2: Amplification of the potato (*S. demissum*) R1 allele conferring resistance to *P. infestans* carrying Avr1, with allele-specific primers 76-2sf2 and 76-2SR (BALLVORA et al. 2002). The R1-fragment is absent in MF-II and TPS67, but present in R1, R5, R6, R9, La (Laura) and LD (Linzer Delikatess).

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

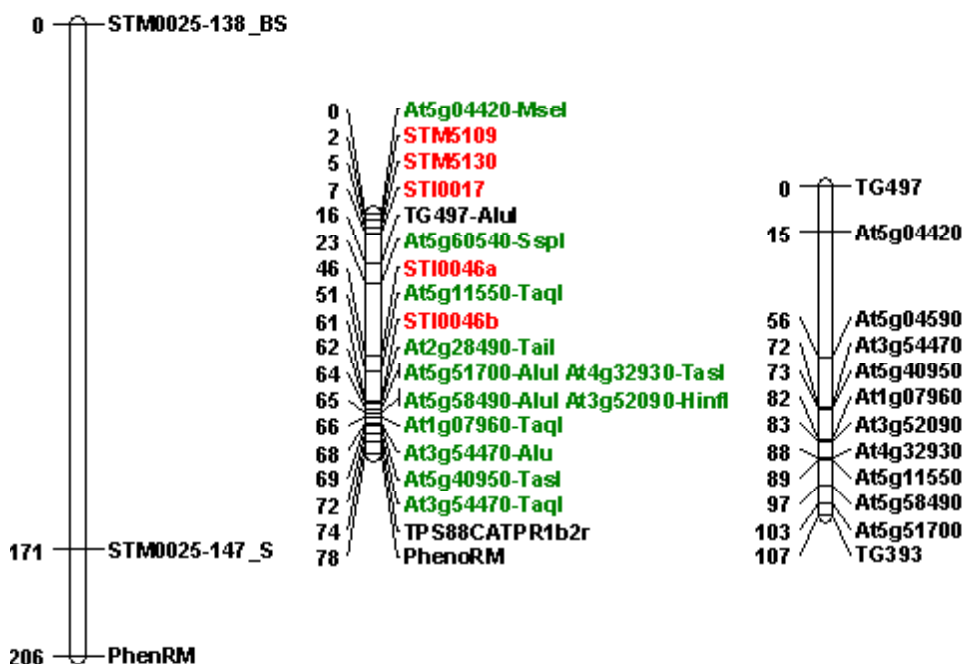


Figure 3: Map of Chromosome XI for the MT population and localization of the novel gene *Rpi-tbrM1* conferring resistance to late blight. Left; framework map, the resistance marker is indicated as PhenRM. Right; corresponding region of the tomato chromosome XI and location of COS II markers. Centre;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

² Helmholtz Centre Munich, Inst. of Ecological Chemistry, 85764 Neuherberg, Germany

³ University of Zurich, Dept. of Microbiology, 8008 Zurich, Switzerland

⁴ Helmholtz Centre Munich, Dept. of Plant-Microbe Interactions, 85764 Neuherberg, Germany

* 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

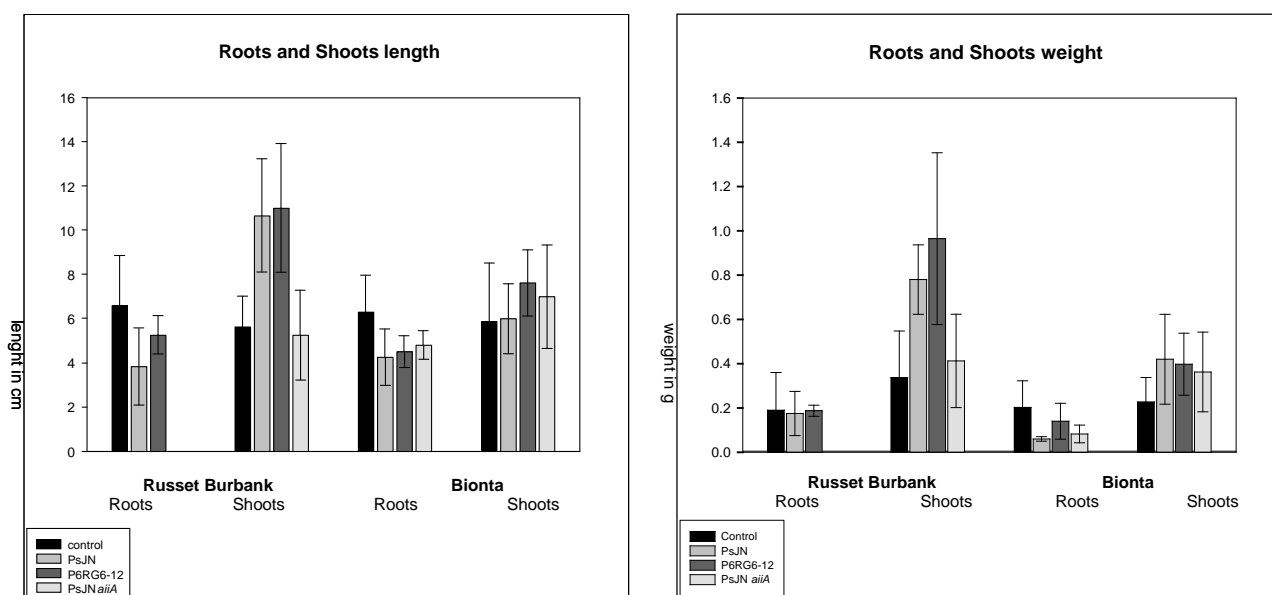
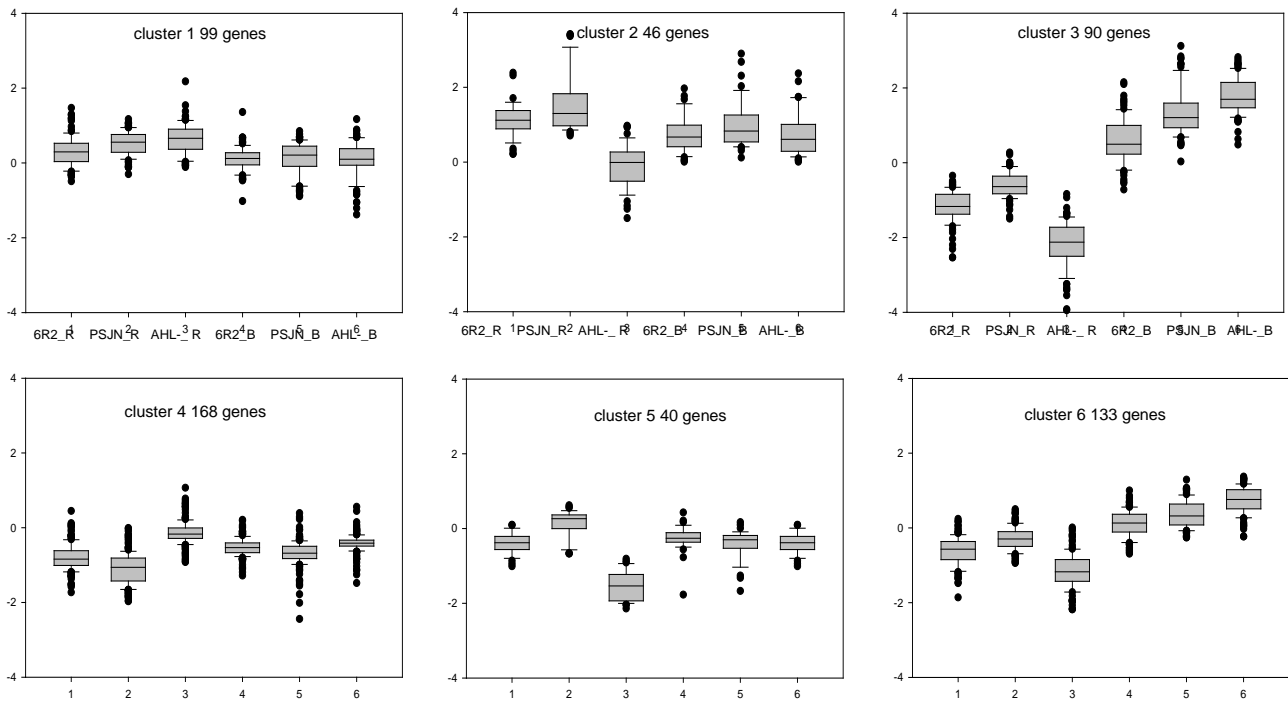


Figure 1: Root and shoot length (A) and weight (B) of plantlets after inoculation with strains PsJN, RG6-12 and PsJN-*aiiA* or not inoculated

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 analyse of differential 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 doi:10.1046/j.1365-313-X.2003.01867.x. *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. *Hort. Science* 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.

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 Stärkestoffwechsel 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 Arrayers 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 Binjete 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 die ausgewählten Klone von dort bestellt. Als Auswahlkri-

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

² NÖ Saatenbauernschaft, 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	
	Stärkemetabolismus		124
	Stärkeregulatoren (Literatur) Stärkeregulatoren (Co-expression)		35 78
Knollen-, Blütenbildungsregulatoren		57	
Gesamt		684	

terien 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. Die Auswahlkriterien wurden anhand der Literatur sowie

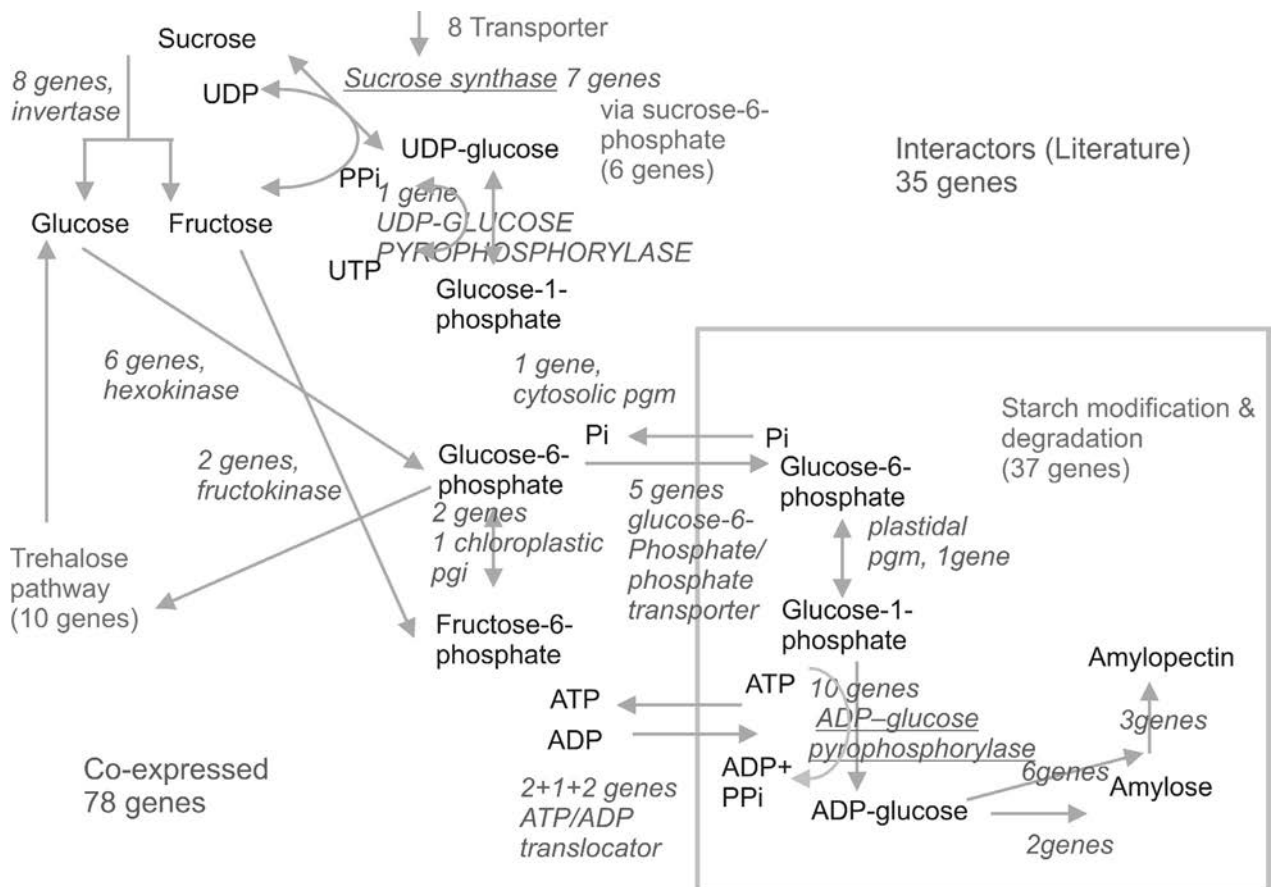


Abbildung 1: Ausschnitt aus dem Stärkestoffwechsel mit Anzahl der auf dem Microarray vorhandenen Gensonden

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 Krautfäule-resistenz 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, 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.

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@arcs.ac.at

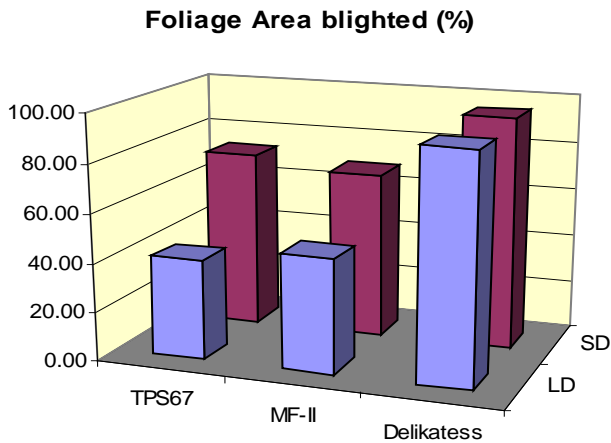


Figure 1: Effect of photoperiod on late blight resistance of potato. Cultivars TPS67 and MF-II carrying active blight resistance genes developed after 4 wk 15-h-day (LD) higher resistance levels to blight than after 8-h lighting (SD). The susceptible and early cultivar Linzer Delikatess remained equally 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](http://magnum.bibvb.ac.at/ALEPH/-/ext-find?bas e=ACC01&find=IDN=AC04118996)).

Molecular Breeding Research with Sugar Beet

Friedrich J. Kopsisch-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 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 vernalization received during winter. 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, LANGE et al. 2008, 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 vernali-

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

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

zation 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. TUVESSESSON, 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, 2008: Quantitative trait locus responsible for resistance to Aphanomyces root rot (black root) caused by Aphanomyces cochlioides Drechs. in sugar beet. *Theor. Appl. Genet.*
- 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 (KRYSAN 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

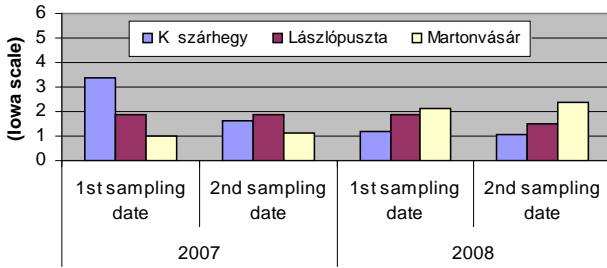


Figure 1: Root injury in different locations, averages of hybrids (2007-2008)

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).

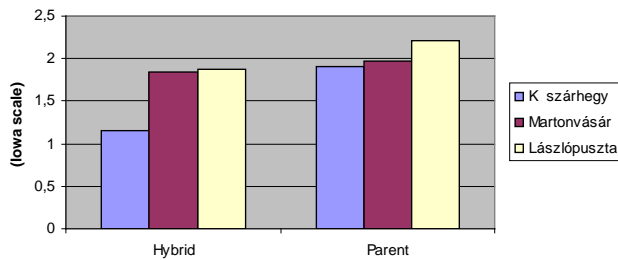


Figure 3: Root injury of the hybrids and lines in different locations (First sample, 2008)

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

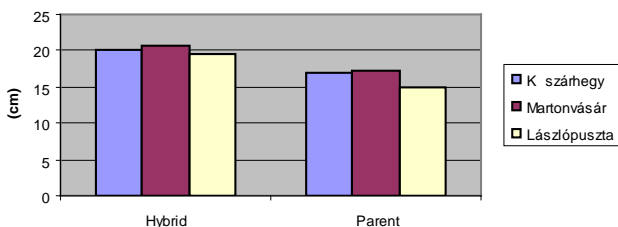


Figure 4: Root size of the hybrids and lines in different locations (First sample, 2008)

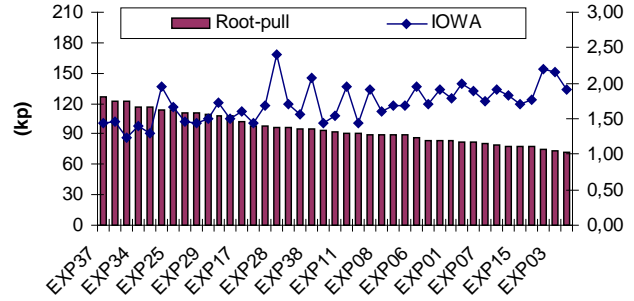


Figure 2: Root-pull and root injury of the hybrids (average of 3 locations, 2 years and 2 samples)

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, 6: 1814-1821.

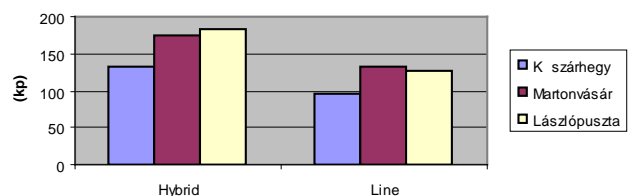


Figure 5: Root pull values of the hybrids and lines in different locations (First sample, 2008)

- 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: 2-3 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: 3-4 173-182.
- 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 Agroforum, (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 (4) 397-403.
- RIPKA, G., 2007: A kukoricabogár magyarországi elterjedése és kártétele. Mag kutatás, fejlesztés és környezet. XXI: 4-5. 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 (1), 71-79.