

Nachwuchswissenschaftlerforum 2009

- Doczi, R., Kondrak, M., Kovacs, G., Beczner, F., Banfalvi, Z. (2005): Conservation of the drought-inducible *DS2* genes and divergences from their *ASR* paralogues in solanaceous species. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**:269–276.
- Gopal, J., Iwama, K. (2007): In vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Rep* **26**:693–700.
- Lahlou, O., Ouattar, S., Ledent, J.-F. (2003): The effect of drought and cultivar on growth parameters, yield and yield components of potato. *Agronomie* **23**:257–268.
- Rensink, W., Hart, A., Liu, J., Ouyang, S., Zismann, V., Buell, C.R. (2005): Analyzing the potato abiotic stress transcriptome using expressed sequence tags. *Genome* **48**:598–605.
- Rozen, S., Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Totowa, NJ: Humana Press.
- Schafleitner, R., Rosales, R.O.G., Gaudin, A., Aliaga, C.A.A., Martinez, G.N., Marca, L.R.T., Bolivar, L.A., Delgado, F.M., Simon, R., Bonierbale, M. (2007): Capturing candidate drought tolerance traits in two native Andean potato clones by transcription profiling of field grown plants under water stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**:673–690.
- Seddig, S., Balko, C. (1998): N-metabolism in potatoes under drought stress – conditions and consequences. *Beiträge zur Züchtungsforschung*, **4**(2):175–176
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**(7):research0034.I-0034.II.
- Watkinson, J.I., Hendricks, L., Sioson, A.A., Heath, L.S., Bohnert, H.J., Grene, R. (2008): Tuber development phenotypes in adapted and acclimated, drought-stressed *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* have distinct expression profiles of genes associated with carbon metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**:34–45.

Schwander, Florian; Eibach, Rudolf

Julius Kühn-Institut, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen

Neue molekulare Marker für die Rebenzüchtung zur gezielten Pyramidierung der Resistenz gegenüber dem Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*)

New molecular markers for downy mildew (*Plasmopara viticola*) resistance as a tool for pyramiding resistance genes in grapevine breeding

Zusammenfassung

Molekulare Marker eröffnen neue Möglichkeiten für eine effiziente, zielgerichtete und beschleunigte Züchtung neuer Rebsorten. Von besonderem Interesse sind sie beispielsweise im Hinblick auf die gezielte Kombination verschiedener Abwehrmechanismen in einer Pflanze (Pyramidierung) zur Etablierung einer hohen und dauerhaften Resistenz. Zu diesem Zweck sollen neue Molekulare Marker für die aus der asiatischen Wildart *Vitis amurensis* stammenden *Plasmopara*-Resistenzmechanismen entwickelt und für die Züchtung nutzbar gemacht werden.

Stichwörter: *Plasmopara viticola*; Resistenzzüchtung; Molekulare Marker; Blattscheibentest

Abstract

Molecular markers are a superior tool to make grapevine breeding more efficient and faster. A matter of particular interest is to identify the combination of different defence mechanisms in one plant to select durable highly resistant plants. For this case we are developing new molecular markers to detect the resistance mechanisms out of the Asian wild type *Vitis amurensis* against downy mildew (*Plasmopara viticola*) to use them in our marker based breeding program.

Keywords: *Plasmopara viticola*; resistance breeding; molecular marker; leaf disc test

Einleitung

Resistenz gegen *Plasmopara viticola*: *Plasmopara viticola*, der Erreger des Falschen Mehltaus an der Rebe, ist eines der Hauptpathogene im europäischen Weinbau. Der pilzliche Erreger aus der Klasse der Oomyceten wurde 1878 von Amerika nach Europa eingeschleppt und nur intensive Pflanzenschutzmaßnahmen können bei den europäischen Rebsorten der Art *Vitis vinifera* hohe Ertrags- und Qualitätseinbußen verhindern. Zwischenzeitlich wurden im Rahmen der Resistenzzüchtung bei Reben neue Sorten mit guten Resistenzeigenschaften gegenüber *P. viticola* entwickelt, die eine deutliche Reduktion der Pilzbekämpfungsmaßnahmen erlauben.

Die Resistenz lässt sich in den meisten Fällen, wie beispielsweise auch bei der neuen Rebsorte 'Regent', auf die Nutzung amerikanischer Wildarten als Resistenzquelle zurückführen. Aus Untersuchungen an einer Kreuzungspopulation zwischen 'Regent' x 'Lemberger' konnten, für die auf diese Resistenzquelle zurückzuführende *Plasmopara*-Resistenz, bereits ein Haupt-QTL (quantitative trait locus) und mehrere resistenzkorrelierende Mikrosatelliten-Marker (SSR-Marker) identifiziert werden (Fischer et al. 2004, Welter et al. 2007, Zyprian et al. 2004).

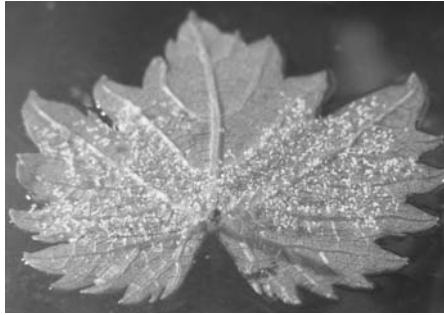


Abb. 1 Stark mit *Plasmopara viticola* infizierte Blattunterseite. *P. viticola* konnte durch die Spaltöffnungen (Stomata) in das Blatt eindringen, es infizieren und Sporangienträger ausbilden. Diese dienen der Verbreitung des Parasiten und sind auf dem Bild als weißer Pilzrasen zu erkennen

Es gibt jedoch auch Sorten wie beispielsweise 'Solaris', deren Resistenzeigenschaften aus der asiatischen Wildart *Vitis amurensis* stammen. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass 'Solaris' die bereits bekannten molekularen Marker der amerikanischen Resistenzen nicht besitzt, hier also offensichtlich andere Resistenzgene für die Abwehr von *P. viticola* verantwortlich sind. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass 'Solaris' bei einem Kontakt mit dem Pathogen die Spaltöffnungen (Stomata) durch Callose-Ablagerungen verschließt und *P. viticola* somit am Eindringen hindert (Gindro et al., 2003). Außerdem ist beschrieben, dass die Infektion mit *P. viticola* in Solaris zu einer Bildung der für diesen Parasiten toxischen Stilbene ϵ - und δ -Viniferin führt (Pezet et al. 2004, Pezet et al. 2004b).

Markerunterstützte Selektion in der Züchtung: Die Kreuzung von pathogenresistenten und zugleich qualitativ hochwertigen Rebsorten erfordert im Rahmen der konventionellen Züchtung 25 bis 30 Jahre. Es ist zu erwarten, dass sich diese Zeitspanne mit Hilfe von molekularen Markern zukünftig um etwa 10 Jahren verkürzen lässt. Die markergestützte Selektion ermöglicht darüber hinaus eine gezielte Kombination verschiedener Resistenzmechanismen in einer neuen Sorte (Pyramidisierung), was zu einer stabileren Resistenz führt (Eibach et al. 2007). Darum sollen molekulare Marker für die aus *Vitis amurensis* stammenden Resistenzeigenschaften gegen *P. viticola* identifiziert und für die Züchtung nutzbar gemacht werden.

Material & Methoden

Kreuzungspopulation: Für die Untersuchungen wird die F1- Generation aus der Kreuzung Gf.Ga-52-42 x 'Solaris' verwendet. Die Population umfasst aktuell 273 Individuen. Der Zuchtstamm Gf.Ga-52-42 ('Bacchus' x 'Villard blanc') ist aus der Resistenzzüchtung des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof hervorgegangen und besitzt die bekannten resistenzkorrelierten *Plasmopara*-Marker, die auch die Sorte 'Regent' trägt. Somit kann in der bearbeiteten Kreuzungspopulation von einer unabhängigen Segregation sowohl der auf asiatische als auch auf amerikanische Quellen zurückzuführenden Resistenzeigenschaften ausgegangen werden. Es sind in der Kreuzungspopulation Individuen zu erwarten, die eine Kombination beider Resistenzen aufweisen, deren Resistenzen also pyramidiert sind.

Gf. Ga-52-42



Solaris



x

Bild: JKI, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof

Bild: Staatliches Weinbauinstitut Freiburg

Abb. 2 Trauben der beiden Kreuzungseltern

Ermittlung der *Plasmopara*-Resistenz: Die phänotypische Bewertung der *Plasmopara*-Resistenz aller Individuen der Kreuzungspopulation erfolgte anhand von Blattscheibentests. Dazu wurden je Individuum vier Blattscheiben mit einem Korkbohrer ($\varnothing = 17 \text{ mm}$) ausgestanzt und mit der Blattoberseite auf 0,8%igen Wasser-Agar gelegt. Die Infektion erfolgte mit einem 40 μl -Tropfen einer *Plasmopara*-Sporensuspension (20000 Sporangiosporen/ml) mit einer anschließenden Inkubation im Dunkeln bei 25°C. Nach 16 h wurde der Suspensionstropfen abgesaugt und die Blätter für 6 weitere Tage bei Tageslicht inkubiert. Die Infektionen wurden unter dem Binokular mit 10facher Vergrößerung betrachtet und nach dem Schema Nr. 452 der OIV (International Organisation of Vine and Wine) von 1 (sehr geringe) bis 9 (sehr hohe oder totale Resistenz) bewertet. Um die Bewertung auf die mikroskopische Ebene anzupassen, wurden die Boniturnoten an der Anzahl gebildeter Sporangienträgern (ST) festgemacht (Boniturnote 1=dichter ST-Teppich; 3=über 20 ST; 5=6-20 ST; 7=1-5 ST; 9=kein ST).

Ergebnisse

Ermittlung der *Plasmopara*-Resistenz in der Kreuzungsnachkommenschaft: Gute phänotypische Daten sind eine wichtige Voraussetzung um die Resistenzgene gegen *Plasmopara* lokalisieren zu können. Blattscheibentests haben sich als eine gute Methode erwiesen, um die Ausprägung der *Plasmopara*-Resistenz zu ermitteln. Diese Methode erlaubt eine Evaluation vieler Individuen unter standardisierten Bedingungen, ohne dass dabei die Pflanzen selbst dem Stress einer Infektion ausgesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse von Infektionsversuchen an Blattscheiben, abgetrennten Blättern und ganzen Pflanzen eine hohe Korrelation aufweisen (Boso et al. 2008), was die Aussagekraft des Blattscheibentests bestätigt. Im Jahr 2009 wurden drei Bonituren mit jeweils vier Blattscheiben von allen Individuen der Kreuzungs-population durchgeführt.

Die Abbildung 3 zeigt, dass das Merkmal der *Plasmopara*-Resistenz in der bearbeiteten Population aufspaltet. Es befinden sich darunter sowohl hoch anfällige, als auch resistente Individuen und eine große Anzahl, die eine mittlere Resistenz aufweist. Nach Abschluss der zurzeit laufenden Arbeiten zur Erstellung einer genetischen Karte für diese Kreuzungspopulation werden die gewonnenen phänotypischen Daten einer Analyse hinsichtlich des Auftretens von QTLs für die *Plasmopara*-Resistenz unterzogen.

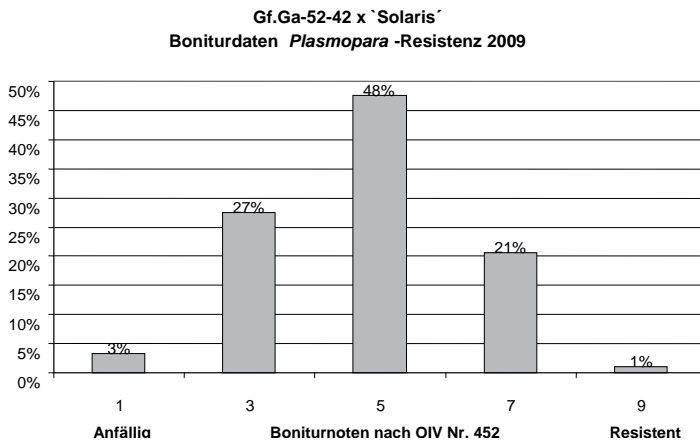


Abb. 3 Verteilung der Nachkommenschaft Gf.Ga-52-42 x `Solaris` (n=273) in die Klassen der Anfälligkeit gegen *Plasmopara viticola*. Ergebnisse aus den Boniturdaten 2009.

Die Boniturdaten sollen im nächsten Jahr durch weitere Blattscheibentests und eventuell auftretenden natürlichen Befall der Individuen nach dem Auspendeln ins Freiland verifiziert werden.

Diskussion und Ausblick

Möglichst exakte und fundierte phänotypische Daten sind eine Grundvoraussetzung um deren Loci auf genomischer Ebene bestimmen zu können. Die Ermittlung der Resistenz stellt dabei den ersten Schritt dar. Es ist geplant noch weitere phänotypische Resistenzmerkmale wie die Bildung von Stilbenen als Reaktion der Pflanze auf eine Infektion zu untersuchen. Die genetische Karte der Kreuzungspopulation wird unter der Verwendung von fluoreszenzmarkierten SSR-Markern erstellt, die, um Zeit und Ressourcen zu sparen, in einem Multiplex-Verfahren eingesetzt werden. Dies bedeutet, dass mehrere SSR-Marker mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen in einem PCR-Ansatz kombiniert eingesetzt und im „Genetic Analyzer“ parallel detektiert werden. Die vorhandene Technik erlaubt dabei den Einsatz von fünf verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen, wobei eine Markierung für den Größenmarker benötigt wird. Bei einer Abdeckung von etwa vier bis fünf Markern auf jedem der 19 Chromosomen ist eine erste grobe Verrechnung der Datensätze vorgesehen. Auf den Chromosomen auf denen QTL

identifiziert werden können, lässt sich anschließend durch eine gezielte Feinkartierung der Resistenzlocus näher eingrenzen und ein für die Züchtung geeigneter Marker ableiten.

Literatur

- Boso, S., Kassemeyer, H.H., 2008: Different Susceptibility Of European Grapevine Cultivars For Downy Mildew. *Vitis* **47** (1), 39-49.
- Eibach, R., Zyprian, E., Welter, L., Töpfer, R., 2007: The Use Of Molecular Markers For Pyramiding Resistance Genes In Grapevine Breeding. *Vitis* **46** (3), 120-124.
- Fischer, B.M., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., 2004: Quantitative Trait Locus Analysis Of Fungal Disease Resistance Factors On A Molecular Map Of Grapevine. *Theoretical And Applied Genetics* **108** (3), 501-515.
- Gindro, K., Pezet, R., Viret, O., 2003: Histological Study Of The Responses Of Two *Vitis Vinifera* Cultivars (Resistant And Susceptible) To *Plasmopara Viticola* Infections. *Plant Physiology And Biochemistry* **41** (9), 846-853.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., Richter, H., 2004a: Effects Of Resveratrol, Viniferins And Pterostilbene On *Plasmopara Viticola* Zoospore Mobility And Disease Development. *Vitis* **43** (3), 145-148.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., Spring, J.L., 2004b: Glycosylation And Oxidative Dimerization Of Resveratrol Are Respectively Associated To Sensitivity And Resistance Of Grapevine Cultivars To Downy Mildew. *Physiological And Molecular Plant Pathology* **65** (6), 297-303.
- Welter, L.J., Gokturk-Baydar, N., Akkurt, M., 2007: Genetic Mapping And Localization Of Quantitative Trait Loci Affecting Fungal Disease Resistance And Leaf Morphology In Grapevine (*Vitis Vinifera* L). *Molecular Breeding* **20** (4), 359-374.
- Zyprian, E.M., Eibach, R., Töpfer, R., 2004: Die Genetische Karte Von 'Regent'. *Deutsches Weinbau Jahrbuch* 2004, 150-157.

Herzog, Katja¹; Flachowsky, Henryk¹; Deising, Holger²; Hanke, Magda-Viola¹

¹ Julius Kühn-Institut, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Dresden; ² Martin-Luther-University, Faculty of Natural Sciences III, Institute of Agricultural and Nutritional Sciences, Phytopathology and Plant Protection, Halle (Saale)

Ergebnisse zur Etablierung alternativer Strategien zur Erzeugung markergen-freier Apfelpflanzen mit erhöhter Resistenz

Preliminary results to generate marker-free apples (*Malus domestica* BORKH.) with increased fungal resistance

Abstract

The production of genetically modified (gm)-plants without selectable marker genes is one of the most important goals of genetic engineering in apple. Therefore, we started the development and establishment of an effective transformation system to generate marker-free apple plants. The system is based on a site-specific recombination of the selectable marker gene *npII* controlled by a heatshock-inducible promoter. We tested the system using a monitoring vector which combines the inducible site-specific recombinase for the precise elimination of *npIII* and a GUS encoding gene (*gusA*) to realize a histochemical monitoring of recombination events. Partial marker-free apple plants were obtained after heat shock and fully marker-free plants were generated following a second regeneration strategy. The oral presentation focused on this part of the project. Apple powdery mildew *Podosphaera leucotricha* (Ell. Et Ev) SALM. belongs to the economical important fungal pathogens in apple production and causes decreased yield as well as reduced fruit quality. To increase resistance against *Podosphaera leucotricha* we transformed apple plants with a specific construct. Transgenic plants were selected, characterized by molecular techniques and tested for their resistance to powdery mildew. Four of the five tested transgenic lines showed significantly reduced symptoms of disease compared to control plants.

Keywords: *Malus domestica*, *npIII*, marker-free, site-specific recombination system

Admassu, Belayneh; Friedt, Wolfgang; Ordon, Frank

Julius Kühn-Institut, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz (RS), Quedlinburg

Diversity of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Population in Ethiopia and Stem Rust Resistance Genes in Wheat

Abstract

Ethiopia is the second largest wheat producer in sub-Saharan Africa next to South Africa. It is an important food grain cultivated on ca. 1.4 million ha. The national average productivity is estimated at 1.7 tons/ha. The low productivity is attributed to a number of factors including diseases like stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*). As a result of a recent spread of a new and highly virulent race called Ug99, stem rust is becoming a serious threat to wheat production in Ethiopia and other east African countries. Durable stem rust control in wheat requires detailed knowledge on virulence spectrum and genetic diversity of *Pgt*. Molecular markers were proven to be easier and more efficient than the conventional method in variety development for disease resistance. Hence, this project studied the virulence and genetic structure of *Pgt* populations in Ethiopia, and developed a genetic map of a