

4 3 3

Julius-Kühn-Archiv

Günter Schumann, Christoph Stephan, Gabriele Haring

Erstes Symposium Zierpflanzenzüchtung

in Quedlinburg, 15.-16. November 2011

- Proceedings -



Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI)

Das Julius Kühn-Institut ist eine Bundesoberbehörde und ein Bundesforschungsinstitut. Es umfasst 15 Institute zuzüglich gemeinschaftlicher Einrichtungen an zukünftig sechs Standorten (Quedlinburg, Braunschweig, Kleinmachnow, Dossenheim, Siebeldingen, Dresden-Pillnitz) und eine Versuchsstation zur Kartoffelforschung in Groß Lüsewitz. Quedlinburg ist der Hauptsitz des Bundesforschungsinstituts.

Hauptaufgabe des JKI ist die Beratung der Bundesregierung bzw. des BMELV in allen Fragen mit Bezug zur Kulturpflanze. Die vielfältigen Aufgaben sind in wichtigen rechtlichen Regelwerken, wie dem Pflanzenschutzgesetz, dem Gentechnikgesetz, dem Chemikaliengesetz und hierzu erlassenen Rechtsverordnungen, niedergelegt und leiten sich im Übrigen aus dem Forschungsplan des BMELV ab. Die Zuständigkeit umfasst behördliche Aufgaben und die Forschung in den Bereichen Pflanzengenetik, Pflanzenbau, Pflanzenernährung und Bodenkunde sowie Pflanzenschutz und Pflanzengesundheit. Damit vernetzt das JKI alle wichtigen Ressortthemen um die Kulturpflanze – ob auf dem Feld, im Gewächshaus oder im urbanen Bereich – und entwickelt ganzheitliche Konzepte für den gesamten Pflanzenbau, für die Pflanzenproduktion bis hin zur Pflanzenpflege und -verwendung. Forschung und hoheitliche Aufgaben sind dabei eng miteinander verbunden.

Weiterführende Informationen über uns finden Sie auf der Homepage des Julius Kühn-Instituts unter <http://www.jki.bund.de>. Spezielle Anfragen wird Ihnen unsere Pressestelle (pressestelle@jki.bund.de) gern beantworten.

Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for cultivated plants (JKI)

The Julius Kühn-Institut is both a research institution and a higher federal authority. It is structured into 15 institutes and several research service units on the sites of Quedlinburg, Braunschweig, Kleinmachnow, Siebeldingen, Dossenheim und Dresden-Pillnitz, complemented by an experimental station for potato research at Groß Lüsewitz. The head quarters are located in Quedlinburg. The Institute's core activity is to advise the federal government and the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection in particular on all issues relating to cultivated plants. Its diverse tasks in this field are stipulated in important legal acts such as the Plant Protection Act, the Genetic Engineering Act and the Chemicals Act and in corresponding legal regulations, furthermore they arise from the new BMELV research plan.

The Institute's competence comprises both the functions of a federal authority and the research in the fields of plant genetics, agronomy, plant nutrition and soil science as well as plant protection and plant health. On this basis, the JKI networks all important departmental tasks relating to cultivated plants – whether grown in fields and forests, in the glasshouse or in an urban environment – and develops integrated concepts for plant cultivation as a whole, ranging from plant production to plant care and plant usage. Research and sovereign functions are closely intertwined.

More information is available on the website of the Julius Kühn-Institut under <http://www.jki.bund.de>. For more specific enquiries, please contact our public relations office (pressestelle@jki.bund.de).

**Gemeinschaft der Förderer und Freunde
des Julius Kühn-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen e.V. (GFF)**

Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg,

Tel.: 03946 47-200, E-Mail: GFF@jki.bund.de

Internet: <http://www.jki.bund.de/> Bereich "Über das JKI"

4 3 3

Julius-Kühn-Archiv

Günter Schumann, Christoph Stephan, Gabriele Haring

Erstes Symposium Zierpflanzenzüchtung

in Quedlinburg, 15.-16. November 2011

- Proceedings -



Autoren:

Dr. Günter Schumann
Institut für Züchtungsforschung
an gartenbaulichen Kulturen und Obst
Erwin-Baur-Str. 27
06484 Quedlinburg

Dr. Christoph Stephan
Bundesverband Deutscher
Pflanzenzüchter e.V. (BDP)
Kaufmannstraße 71-73
53115 Bonn

Gabiele Harring
Bundesverband Zierpflanzen (BVZ)
Godesberger Allee 142-148
53175 Bonn

Foto Titel:

B. Banse

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISSN 1868-9892

ISBN 978-3-930037-83-4

DOI 10.5073/jka.2011.433.000

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, 2011. Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben bei auch nur auszugsweiser Verwertung vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der Fassung vom 24. Juni 1985 zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

Printed in Germany by Arno Brynda GmbH, Berlin.

Inhaltsverzeichnis

Begrüßung und Eröffnung	4
Hiep, Heinrich; Von Broock, Reinhard; Von Kameke, Kartz	
Die Deutsche Genbank Zierpflanzen - Beitrag zur Erhaltung und Nutzung pflanzengenetischer Ressourcen national und international	5
Harrer, Siegfried	
Aktuelle Entwicklungen zum Aufbau der Deutschen Genbank Zierpflanzen beim Bundessortenamt	12
Spellerberg, Burkhard	
Nutzung molekularer Marker in der Züchtung von Heide (<i>Calluna vulgaris</i>)	14
Hohe, Annette; Behrend, Anne	
Biotechnologische Methoden für die züchterische Verbesserung von Zierpflanzen	18
Mibus, Heiko; Serek, Margrethe; Winkelmann, Traud	
Methodische Ansätze zur Verbesserung der Trockenstresstoleranz durch markergestützte Selektion	29
Ordon, Frank; Seddig, Sylvia; Bartelmann, Anne; Balko, Christiane	
Entwicklung von Screening-Verfahren zur Bewertung der Trockenstresstoleranz von Zierpflanzen	33
Boehm, Robert; Krato, Theresa; Dohm, Andrea; Hendriks, Ludger	
Zugang zu neuen FuE-Konzepten durch innovative Verfahren der Pflanzenphänotypisierung	40
Altmann, Thomas	
Resistenzevaluierung mittels eines digitalen Bildanalysesystems am Beispiel von <i>Rhododendron</i>	46
Plaschil, Sylvia; Krämer, Reiner	
Forschungsergebnisse zur Sternrußtauresistenz bei Rosen	55
Lühmann, Ann-Katrin; Terefe, Diro; Kohlenberg, Max; Linde, Marcus; Debener, Thomas	
Autoren	64

Begrüßung und Eröffnung

Hiep, Heinrich¹; Von Broock, Reinhard²; Von Kameke, Kartz³

¹ Vorsitzender des Bundesverbandes Zierpflanzen (BVZ) im Zentralverband Gartenbau e.V.

² Vorsitzender der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP)

³ Vorsitzender des Bundesverbandes Deutscher Pflanzenzüchter e.V. (BDP)

DOI: 10.5073/jka.2011.433.001

Liebe Zierpflanzenzüchter,

Zierpflanzen prägen mit ihrer großen Artenvielfalt das Bild unserer Gesellschaft. Sie tragen wesentlich zur Verbesserung des menschlichen Lebensraumes bei: sowohl im Außen- als auch im Innenbereich. Umgeben von vitalen, schönen und farbenfrohen Zierpflanzen fühlt sich der Mensch wohl und inspiriert.

Die Zierpflanzenzüchtung ist der Motor der Zierpflanzenproduktion. Deutschland ist neben den Niederlanden der bedeutendste Züchtungsstandort in der Welt. Diesen gilt es zu stärken! Denn der deutsche Zierpflanzenbau lebt noch immer von der Qualität seiner Züchtungsergebnisse.

Der Ihnen vorliegende Tagungsband zeigt, dass im Mittelpunkt des Symposiums Inhalte zur Forschung und Entwicklung rund um die Zierpflanzenzüchtung stehen.

Unser Dank gilt den Referenten und ganz besonders JKI-Präsident Prof. Dr. Georg F. Backhaus und seinen Mitarbeitern, insbesondere Prof. Dr. Günter Schumann.

Dieses Symposium stellt einen erfolgreichen Baustein dar auf dem Wege, die Forschung im Zierpflanzenbereich zu intensivieren und zu vernetzen. Es gilt, der überwiegend mittelständisch geprägten Branche Lösungen zur Bewältigung künftiger Herausforderungen wie dem Klimawandel bereitzustellen. Nur gemeinsam kann uns das gelingen.

Ihre



Heinrich Hiep
BVZ



Dr. Reinhard von Broock
GFP



Dr. Kartz von Kameke
BDP

Die Deutsche Genbank Zierpflanzen - Beitrag zur Erhaltung und Nutzung pflanzengenetischer Ressourcen national und international

German Genebank for Ornamental Plants- Contribution to the Conservation and Use of Plant Genetic Resources national and international

Harrer, Siegfried

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Ref. 513 – Informations- und Koordinationszentrum für Biologische Vielfalt, Deichmanns Aue 29, 53179 Bonn,
Tel.: 0228-6845-3240, E-Mail: Siegfried.Harrer@ble.de

DOI: 10.5073/jka.2011.433.002

Zusammenfassung

Zierpflanzen bilden mit ihrer enormen Vielfalt an Arten, Varietäten und Sorten einen wichtigen Bestandteil der pflanzengenetischen Ressourcen und somit der biologischen Vielfalt insgesamt. Relevante Rahmenbedingungen für deren Erhaltung und nachhaltige Nutzung wie z.B. das Übereinkommen über die Biologische Vielfalt und der internationale Vertrag über pflanzengenetische Ressourcen werden erläutert und der Stand der nationalen Umsetzung dargestellt. Vor diesem Hintergrund wird der Auf- und Ausbau der Deutschen Genbank Zierpflanzen vorgestellt und deren Beitrag zur Umsetzung der nationalen und internationalen Vorgaben.

Stichwörter: Genbank, Zierpflanzen

Abstract

Ornamental plants with their enormous variety of species and varieties do build an important part of plant genetic resources and by this of the biological diversity as a whole. Relevant frameworks, such as the Convention on Biological Diversity and the International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture are described as well as the state of their national implementation. Against this background the constitution and further development of the national Genebank for Ornamentals will be outlined as well as the contributions to the implementation of the afore mentioned international framework.

Keywords: genebank, ornamental plants

Einführung

Weltweit gibt es mehr als 1.750 Genbanken für pflanzengenetische Ressourcen. Davon erhalten die meisten nur kleinere Sammlungen, es gibt allerdings auch ca. 130 Genbanken mit Sammlungen von mehr als 10.000 Mustern. Daneben gibt es umfangreiche Sammlungen pflanzengenetischer Ressourcen auch in den weltweit mehr als 2.500 Botanischen Gärten. Insgesamt werden so weltweit über 7,4 Mio. Muster pflanzengenetischer Ressourcen meist in Form von Samen oder anderem vermehrungsfähigen Material gelagert (FAO, 2010). Diese enorme Vielfalt spiegelt die enge Beziehung zwischen dem Menschen und den von ihm direkt oder indirekt genutzten Pflanzen wider. Für typische landwirtschaftliche Nutzpflanzen hat sich dieses Erhaltungssystem in den letzten 50-80 Jahren international gut etabliert. Allerdings erhalten nur wenige dieser Genbanken auch Zierpflanzensammlungen (z.B. die niederländische und die Nordische Genbank) und dann auch nur in geringem Umfang.

Zierpflanzen als Teil der pflanzengenetischen Ressourcen wurden schon seit den Zeiten eines Alexander von Humboldts und damit schon sehr viel länger als die in der Landwirtschaft für Ernährungszwecke genutzten Pflanzenarten in aller Welt gesammelt. Im Zuge der Entdeckungsreisen gelangten viele exotische Schönheiten nach Europa. Sie wurden zuerst nur in den Gärten und Orangerien der Adligen später aber zunehmend auch in den aufkommenden Botanischen Gärten und durch das reiche Bürgertum kultiviert. Der wahre „Nutzen“ einer Art wurde dabei oft nicht immer gleich erkannt. So kam die Kartoffel als Zierpflanze nach Europa und es dauerte annähernd hundert Jahre, bis sie auch zur Nahrungsmittelproduktion genutzt

wurde. Frühzeitig haben die Menschen damit begonnen, die natürlich vorhandene Vielfalt der Zierpflanzen durch intensive Züchtungsarbeit zu vermehren. Dabei ist in mehreren hundert Jahren Züchtungsarbeit bei vielen Arten eine enorme Vielfalt entstanden, meist durch ästhetische Gesichtspunkte geprägt, aber durchaus auch mit kommerziellem Wert. Die Erhaltung dieser zierpflanzen-genetischen Ressourcen erfolgte lange Zeit in Deutschland weitgehend unkoordiniert in Botanischen Gärten sowie in institutionellen und privaten Sammlungen. Ein umfassendes Konzept und eine nationale Koordination bestehender Aktivitäten fehlte lange Zeit völlig. Um hier Abhilfe zu schaffen, wurde im Jahr 2000, anlässlich eines Symposiums zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung genetischer Ressourcen von Zierpflanzen in Königswinter bei Bonn, dieser Missstand aufgegriffen und in einer Resolution gefordert, unverzüglich mit dem Aufbau einer Zierpflanzenbank als Netzwerk bestehender Sammlungen zu beginnen (ZADI 2001). Es dauerte dann allerdings noch einige Jahre bis erste Aktivitäten zum Auf- und Ausbau der Deutschen Genbank Zierpflanzen erfolgten. Diese wurden in engem Dialog mit allen relevanten auf dem Gebiet der Erhaltung und Nutzung von zierpflanzen-genetischen Ressourcen tätigen Akteuren durchgeführt und leisten seither u.a. auch einen Beitrag im Rahmen internationaler Verpflichtungen, die sich z.B. aus dem Übereinkommen über die Biologische Vielfalt oder dem Internationalen Vertrag ergeben.

Internationale und nationale Rahmenbedingungen

○ **Übereinkommen über die Biologische Vielfalt (CBD):**

Richtungsweisende Festlegungen im Bereich der biologischen Vielfalt erfolgten im Jahre 1992 auf der Konferenz der Vereinten Nationen für Umwelt und Entwicklung in Rio de Janeiro mit dem Übereinkommen über die Biologische Vielfalt (CBD). Die CBD (CBD, 2011) bekräftigt nicht nur die nationale Souveränität in Bezug auf die im jeweiligen Hoheitsgebiet vorkommende biologische Vielfalt, sie erkennt auch explizit das Recht zur staatlichen Regelung des Zugangs zu diesen Ressourcen an. Die Erhaltung der gesamten biologischen Vielfalt, die nachhaltige Nutzung ihrer Bestandteile und eine ausgewogene und gerechte Aufteilung der sich aus ihrer Nutzung ergebenden Vorteile sind gleichgewichtete Ziele der CBD, zu der sich die Vertragsstaaten verpflichten. Insbesondere sind dazu nationale Strategien, Programme und Pläne zu entwickeln oder anzupassen, um die Erhaltung und nachhaltige Nutzung der biologischen Vielfalt in ihre sektoralen Politiken zu integrieren. Die CBD bildet damit seit ihrem Inkrafttreten im Jahre 1993 international auch die zentrale, rechtlich verbindliche Grundlage für die Erhaltung und Nutzung pflanzlicher Vielfalt und deren genetischen Ressourcen. Ausschlaggebend für die Nutzung sind neben der Erhaltung ein ausreichender Zugang zu den genetischen Ressourcen. Im Rahmen der CBD wurden bezüglich des Zugangs zu genetischen Ressourcen und des gerechten Vorteilsausgleichs bei der 6. Vertragsstaatenkonferenz im Jahre 2002 die sogenannten „Bonn-Guidelines on Access to Genetic Resources and Fair and Equitable Sharing of Benefits arising out of their Utilization“ verabschiedet. Sie stellen rechtlich nicht-bindende Empfehlungen für die Vertragsstaaten der CBD dar und beinhalten neben allgemeinen Vorgaben und Handlungshinweisen auch Elemente für eine Materialübertragungsvereinbarung. Unter Berücksichtigung der „Bonn-Guidelines“ folgten danach Verhandlungen über ein „internationales Regime“ zum Thema Vorteilsausgleich, die letztlich mit der Annahme des sogenannten Nagoya-Protokolls auf der 10. Vertragsstaatenkonferenz im Jahr 2010 endeten. Das Nagoya-Protokoll sieht vor, künftig den Zugang zu genetischen Ressourcen und dem damit verbundenen traditionellen Wissen zu erleichtern, gleichzeitig aber die aus der Nutzung entstehenden Vorteile zwischen den Nutzern und dem Ursprungsland der Ressourcen fair und ausgewogen aufzuteilen. Das Protokoll tritt drei Monate nach der fünfzigsten Ratifizierung in Kraft und ist für die Zeichnerstaaten rechtlich bindend. Bereits bestehende internationale Regelungen, wie beispielsweise der Internationale Vertrag über pflanzen-genetische Ressourcen für Ernährung und Landwirtschaft (siehe nächster Abschnitt), werden vom Nagoya-Protokoll explizit anerkannt.

○ **Internationaler Vertrag über pflanzen-genetische Ressourcen für Ernährung und Landwirtschaft:**

Der als Nachfolger des FAO-Undertaking entwickelte und seit Juni 2004 wirksame Internationale Vertrag (International treaty, 2011) über pflanzen-genetische Ressourcen für Ernährung und Landwirtschaft stellt für die Vertragsstaaten eine völkerrechtlich bindende Vereinbarung dar. Mit der Ratifizierung dieses Vertrags verpflichteten sich die Vertragsstaaten, in Übereinstimmung mit der CBD, pflanzen-genetische Ressourcen

für Ernährung und Landwirtschaft *in situ* und *ex situ* zu erhalten, zu charakterisieren und zu evaluieren sowie ihre nachhaltige Nutzung sicherzustellen. Hervorzuheben ist besonders das im Rahmen des Internationalen Vertrages geschaffene Multilaterale System, welches für die Vertragsparteien einen erleichterten Zugang zu etwa 60 Nahrungs- und Futterpflanzen vorsieht. Unter anderem beinhaltet der Internationale Vertrag Regelungen für eine Aufteilung der sich aus der Nutzung pflanzengenetischer Ressourcen ergebenden Vorteile. Diese umfassen Informationsaustausch, Zugang zu und Weitergabe von Technologie, Kapazitätsaufbau sowie Aufteilung der finanziellen und sonstigen Vorteile aus der Vermarktung von Produkten. Erleichterter Zugang wird dabei ausschließlich zu Zwecken der Nutzung für Forschung, Züchtung und Ausbildung für Ernährung und Landwirtschaft gewährleistet. Für die Umsetzung des erleichterten Zugangs wurde eine sogenannte standardisierte Materialübertragungsvereinbarung (SMTA) erarbeitet. Dieser Standardvertrag wird nun bei jeder Weitergabe von Ressourcen, die sich im Multilateralen System befinden, angewendet. Es handelt sich dabei um einen privatrechtlichen Vertrag zwischen dem Bereitsteller und dem Empfänger des pflanzlichen Vermehrungsmaterials. Das SMTA legt die Rechte und Pflichten der Beteiligten abschließend fest und stellt zugleich ein wichtiges Instrument zur Umsetzung des durch den Internationalen Vertrag vorgesehenen fairen Ausgleiches der finanziellen Vorteile, die sich aus der Vermarktung von Produkten ergeben, dar. Vereinfachend ist hierzu anzumerken, dass Zahlungsverpflichtungen erst dann entstehen, wenn aus dem im Rahmen eines SMTA erhaltenen Materials Produkte entwickelt und vermarktet werden und diese nicht mehr frei für Dritte für Forschungs- und Züchtungszwecke zur Verfügung stehen. Solche Einschränkungen sind derzeit nur im Rahmen eines Patentschutzes denkbar, da der im landwirtschaftlichen Bereich übliche Sortenschutz (nach UPOV) entsprechende Ausnahmen (Züchtungsvorbehalt) vorsieht. Über ein SMTA erhaltendes Material sowie daraus entwickeltes Material darf nur wieder mit einem neuen SMTA weitergegeben werden, dadurch wächst das Multilaterale System quasi „von selbst“, allein durch die Nutzung des Materials. Derzeit haben bereits mehr als 125 Staaten den Internationalen Vertrag ratifiziert. Aufgrund des spezifischen Geltungsbereichs des Internationalen Vertrages (Ernährung und Landwirtschaft) fallen Zierpflanzen allerdings nicht unter seinen Geltungsbereich.

○ **Nationale Agrobiodiversitätsstrategie:**

In Umsetzung der bestehenden internationalen Rahmenbedingungen für die Erhaltung und nachhaltige Nutzung der Agrobiodiversität hat das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) 2007 die Agrobiodiversitätsstrategie "Agrobiodiversität erhalten, Potenziale der Land-, Forst- und Fischereiwirtschaft erschließen und nachhaltig nutzen" (BMELV, 2007) als Ergänzung der Nationalen Biodiversitätsstrategie veröffentlicht. Die BMELV-Strategie ergänzt die vom Bundeskabinett beschlossene nationale Strategie für die Erhaltung und nachhaltige Nutzung der biologischen Vielfalt. Sie beinhaltet als zentrales Leitbild „...die Agrobiodiversität als Grundlage für die Agrar- und Ernährungswirtschaft zu erhalten, das ihr innewohnende Potential in innovativer Weise zu erschließen und ihre Bestandteile nachhaltig zu nutzen.“ Hierfür ist es besonders notwendig, die Erhaltungsinfrastruktur zu sichern und auszubauen, die Nutzungssysteme weiter zu entwickeln und die internationale Zusammenarbeit zu verstärken. Die Agrobiodiversitätsstrategie ist sektoral aufgebaut und beinhaltet Leitbilder und Handlungsbedarfe für die einzelnen Bereiche. Für den Gartenbau wird die Erhaltung einer breiten genetischen Basis der Vielfalt bei Zierpflanzen, Gehölzen, Stauden, Arznei- und Gewürzpflanzen, Gemüse und Obst sowie deren nachhaltige Nutzung angestrebt. Hierzu wird in der Strategie u.a. gefordert, „öffentliche und private Sammlungen genetischer Ressourcen von gartenbaulichen Kulturpflanzen zu ergänzen, zu vernetzen und Erhaltungsaktivitäten bundesweit zu koordinieren.“

○ **Fachprogramm zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung pflanzengenetischer Ressourcen landwirtschaftlicher und gartenbaulicher Kulturpflanzen:**

Zur Umsetzung der nationalen Ziele im Bereich genetischer Ressourcen für Landwirtschaft und Ernährung gibt es in Deutschland sektorale Fachprogramme zu Kulturpflanzen, Nutztieren, Forst- und aquatisch genetischen Ressourcen. Diese beinhalten für den jeweiligen Sektor die eigentlichen Arbeitsprogramme, die regelmäßig auch an neue Anforderungen (z.B. im Rahmen der Agrobiodiversitätsstrategie) angepasst werden. Zierpflanzen werden im Rahmen des Nationalen Fachprogramms zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung pflanzengenetischer Ressourcen landwirtschaftlicher und gartenbaulicher Kulturpflanzen behandelt.

Dort wird als ein Handlungsbedarf der weitere Ausbau der Deutschen Genbank Zierpflanzen auf Basis eines mit allen relevanten Partnern und dem BMELV abgestimmten Konzeptes genannt.

Erhaltungsstrukturen

Wie im vorangegangenen Kapitel geschildert, besteht insgesamt bei pflanzengenetischen Ressourcen und damit auch bei zierpflanzengenetischen Ressourcen eine international anerkannte Notwendigkeit der Erhaltung und damit einhergehend ein großer Bedarf an entsprechenden Erhaltungsstrukturen. Prinzipiell kommen Formen der *Ex-situ*-Erhaltung, *In-situ*-Erhaltung oder On-farm-Bewirtschaftung als sich gegenseitig ergänzende Methoden für die Erhaltung von pflanzengenetischen Ressourcen in Frage, wobei in der Praxis v.a. verschiedene Formen der *Ex-situ*-Erhaltung angewandt werden. Die *Ex-situ*-Erhaltung in Deutschland erfolgt v.a. in Genbanken und zu einem geringen Teil auch in Botanischen Gärten. Derzeit betreut die Bundeszentrale Genbank des Leibniz-Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) *Ex-situ*-Sammlungen an drei Standorten und das Julius Kühn-Institut - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI) - Sammlungen von Obst und Reben an zwei Standorten. Das JKI koordiniert auch die Deutsche Genbank Obst und die Deutsche Genbank Reben. Im Aufbau begriffen ist derzeit eine Genbank für Wildpflanzen für Ernährung und Landwirtschaft, in welcher ein Netzwerk von Botanischen Gärten (Koordiniert durch den Botanischen Garten in Osnabrück) sich der *Ex-situ*-Erhaltung von bei uns wild vorkommenden Pflanzenarten mit Relevanz für Ernährung und Landwirtschaft annimmt und dabei v.a. auch die innerartliche Vielfalt berücksichtigen wird. Insgesamt werden über die vorgenannten Strukturen (Abbildung 1) in Deutschland mehr als 160.000 Muster von über 3.000 Arten pflanzengenetischer Ressourcen für Ernährung und Landwirtschaft erhalten. Daneben existiert noch eine Reihe von Spezial- und weiteren Sammlungen, die vorwiegend von Länder- und Kommunal-einrichtungen unterhalten werden, wozu auch die 95 Botanischen Gärten gehören. Diese erhalten ca. 300.000 Muster von pflanzengenetischen Ressourcen, wovon einige für die Landwirtschaft und den Gartenbau von Bedeutung sind.

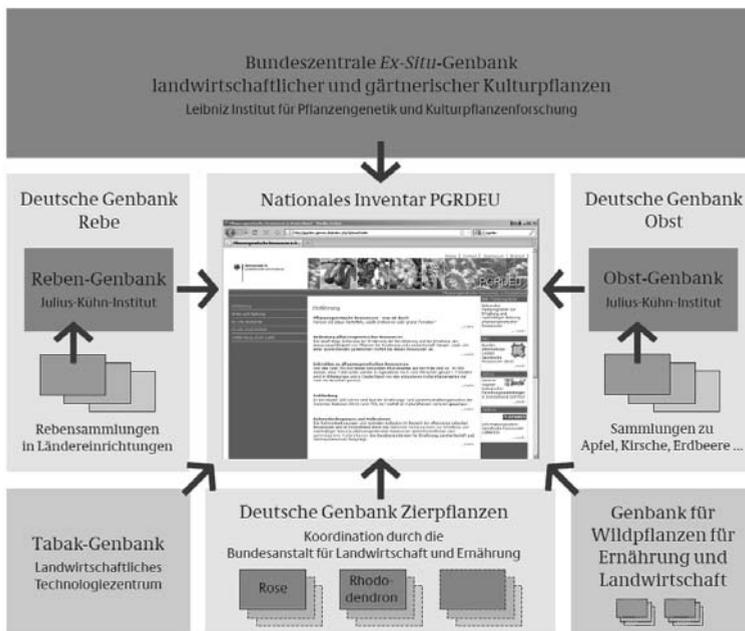


Abb. 1 *Ex-situ*-Erhaltung und Dokumentation von pflanzengenetischen Ressourcen für Ernährung und Landwirtschaft in Deutschland

Trotz des starken Beitrags des Gartenbaus zur Wertschöpfung in der Landwirtschaft und seiner enormen Vielfalt (ca. 3.600 Gattungen mit 18.000 Arten und schätzungsweise 40.000 Sorten) fehlte in Deutschland bislang bei Zierpflanzen eine den landwirtschaftlichen Nutzpflanzen vergleichbare Erhaltungsstruktur. Meist erfolgt die Erhaltung in Botanischen Gärten, die im Gegensatz zu Genbanken mit landwirtschaftlichen Arten ihren Sammlungsschwerpunkt eher in der Artenvielfalt als in der innerartlichen Vielfalt haben. Gerade letztere ist aber von besonderem Interesse, wenn es darum geht, diese Ressourcen für die weiteren züchterischen Verbesserungen der Zierpflanzen sortimente einzusetzen. Daneben bestehen aber gerade bei Zierpflanzen weitere Erhaltungsstrukturen, wie Arboreten, Rosarien, Spezialsammlungen, aber v.a. auch die Sammlungen der vielen Liebhabergesellschaften, über deren Inhalte oft nur wenig bekannt ist. Insgesamt ist auch festzustellen, dass diese verschiedenen Erhaltungsaktivitäten bislang unzureichend bzw. überhaupt nicht koordiniert sind. Hieraus ergeben sich aus übergeordneter Sicht Fragen zur Effizienz solcher Systeme (z.B. wenn gleiche Muster in vielen Sammlungen erhalten werden) und insbesondere zur Gefährdung durch Verlust (z.B. wenn Muster nur einmal in einer Sammlung erhalten werden).

Aufbau der Deutschen Genbank Zierpflanzen

o Vorgeschichte:

Nach dem Symposium „Erhaltung und nachhaltige Nutzung genetischer Ressourcen der Zierpflanzen“ in Königswinter wurde versucht, wie in der Resolution gefordert, unverzüglich mit dem Aufbau einer Zierpflanzenbank als Netzwerk bestehender Sammlungen zu beginnen. Schnell wurde allerdings klar, dass damit Neuland betreten worden war. Im Rahmen eines vom BMELV geförderten Projekts wurden die Erhaltungsstrukturen für verschiedene Zierpflanzen gattungen analysiert und darauf aufbauend Organisationsformen für eine effiziente Erhaltung entwickelt. Die Umsetzung erfolgte dann zuerst bei Rose und Rhododendron aufgrund der dort günstigen Sammlungsstrukturen, ebenfalls im Rahmen von durch das BMELV geförderten Modellvorhaben. Ziel war der Aufbau einer Deutschen Genbank Zierpflanzen, um die Nutzung der zierpflanzen genetischen Ressourcen insbesondere für die Forschung, Züchtung und Ausbildung in Deutschland langfristig und effizient zu sichern und deren Verfügbarkeit zu gewährleisten. Daneben sollten dadurch natürlich auch die sich aus den nationalen und internationalen Rahmenbedingungen ergebenden Anforderungen hinsichtlich der Erhaltung dieser Ressourcen erfüllt werden.

o Netzwerkstruktur:

Die Deutsche Genbank Zierpflanzen ist modular aufgebaut. Die Erhaltungsarbeit erfolgt in Teilnetzwerken, die jeweils eine bestimmte Kategorie von zierpflanzen genetischen Ressourcen bearbeiten. Die Kategorien können dabei einzelne Arten umfassen (z.B. Rosen, Rhododendron), oder Artengruppen (z.B. Gattungen) oder sich auch auf andere Kriterien (z.B. Stauden) umfassen. Jedes Teilnetzwerk bildet für die betreffende „Zierpflanzen gruppe“ eine „Teil-Genbank“ im Rahmen der Deutschen Genbank Zierpflanzen. 2009 wurde die Deutsche Genbank Rose als erster Teil der Deutschen Genbank Zierpflanzen gegründet, im Jahr 2010 wurde als nächstes Teilnetzwerk die Deutsche Genbank Rhododendron gegründet. Für die Ausgestaltung dieser Netzwerke wurde eine generische Struktur entwickelt, die an die jeweils spezifischen Bedingungen in Form einer Kooperationsvereinbarung angepasst werden kann. Dabei gibt es obligate und fakultative Elemente. Rein organisatorisch ist immer die Rolle der koordinierenden Stelle (Koordinationsstelle) für das jeweilige Genbanknetzwerk zu besetzen. Zusätzlich muss auch mindestens eine Einrichtung zumindest Teile ihrer Sammlung als Sammlungsbestand für das betreffende Genbanknetzwerk bereitstellen (Sammlungshaltender Partner). Fakultativ ist die Einbeziehung von Partnern möglich, die zwar keinen eigenen Sammlungsbestand in das Genbanknetzwerk einbringen, dafür aber die Arbeiten im Netzwerk durch eigene Kapazitäten und Expertise unterstützen (Unterstützende Partner). Die Deutsche Genbank Zierpflanzen bildet die Dachorganisation für diese Teilnetzwerke und wird durch das Informations- und Koordinationszentrum für Biologische Vielfalt (IBV) der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) geleitet (Koordinationsstelle der Deutschen Genbank Zierpflanzen). Weitere verbindende Element wie ein gemeinsames Logo sowie ein noch zu etablierender Beirat unterstützen dabei die Einbindung der Teilnetze. Die geschilderte Struktur ist in Abbildung 2 exemplarisch dargestellt, einzelne ausgewählte Elemente davon werden nachfolgend noch weiter beschrieben.

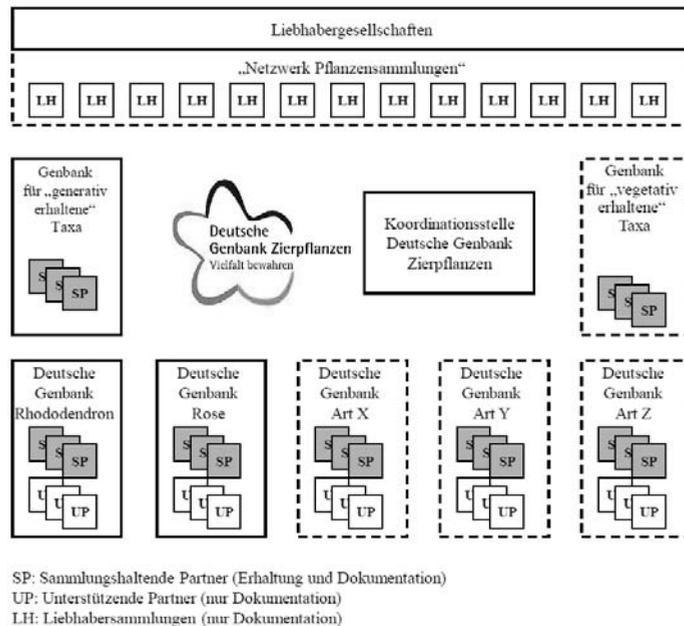


Abb. 2 Organisationsstruktur der Deutschen Genbank Zierpflanzen

Die Etablierung der einzelnen Genbanknetzwerke erfolgt immer durch Abschluss einer Kooperationsvereinbarung. Diese dient dazu, in einer transparenten und verbindlichen Art und Weise, Gegenstand und Ziele der Zusammenarbeit darzustellen und die verschiedenen Rollen und die damit verbundenen Rechte und Pflichten auf die verschiedenen Vertragspartner aufzuteilen. Die Ausgestaltung der Kooperationsvereinbarung erfolgt zwar im Allgemeinen durch die Vertragspartner, dabei müssen dennoch grundsätzliche Vorgaben (z.B. Übernahme von Erhaltungsverantwortung) berücksichtigt werden. Jedes Genbanknetzwerk etabliert sich unter dem Dach der Deutschen Genbank Zierpflanzen und erkennt damit deren Vorgaben (z.B. hinsichtlich Materialabgabe) und die Koordination durch das IBV der BLE an. Grundsätzliche Ziele sind der dauerhafte Betrieb des jeweiligen Genbanknetzwerks aus eigenen Mitteln, mit den Zielen der Sammlung und Erhaltung der betreffenden zierpflanzengenetischen Ressourcen, der Förderung der Nutzung durch Charakterisierung, Evaluierung und Bereitstellung des Materials sowie der gegenseitigen Zusammenarbeit. Jedes Teilnetzwerk wird durch eine Koordinationsstelle geleitet. Sie legt das Arbeitsprogramm fest, koordiniert die Zusammenarbeit, prüft und dokumentiert den gesamten Sammlungsbestand und ist für die Aufnahme von neuen Partnern in das Genbanknetzwerk zuständig. Ferner ist die Koordinationsstelle auch für die Einbindung des Genbanknetzwerks in die Deutsche Genbank Zierpflanzen verantwortlich, hierfür arbeitet sie eng mit dem IBV der BLE zusammen. Sammlungshaltende Partner bilden mit ihren Teilsammlungen den eigentlichen Sammlungsbestand des jeweiligen Genbanknetzwerks. Dabei steht es den Sammlungshaltenden Partnern frei zu entscheiden, welchen Teil ihrer Sammlung sie dem Genbanknetzwerk anbieten, ebenso bleiben natürlich die Eigentumsverhältnisse an diesen Teilsammlungen davon unberührt. Ihre Aufgaben bestehen im Wesentlichen in der langfristigen Erhaltung der genetischen Ressourcen unter einheitlichen Qualitätsstandards sowie in der Charakterisierung und Evaluierung, Dokumentation und Materialbereitstellung. Unterstützende Partner, sofern in einem Genbanknetzwerk beteiligt, unterstützen die Arbeit im Genbanknetzwerk durch ihre Expertise und Einbringung von Kapazitäten (z.B. Vermehrungs- oder Vergleichsanbauten etc.). Sofern sie eigene Sammlungen betreiben, dokumentieren sie diese und stellen diese Informationen der Koordinationsstelle zur Verfügung. Diese Sammlungen bilden somit einen weiteren

„Sicherungs pool“, sind aber nicht Bestandteil der Sammlung des Genbanknetzwerks, somit besteht auch keine Verpflichtung zur dauerhaften Erhaltung und Materialabgabe.

Die Deutsche Genbank Zierpflanzen als Dachorganisation für die Teilnetzwerke wird durch das IBV der BLE koordiniert. Die BLE ist deswegen auch an allen Teilnetzwerken beteiligt. Ihre Aufgaben umfassen die Einbindung der Genbanknetzwerke in das Nationale Fachprogramm zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung pflanzengenetischer Ressourcen landwirtschaftlicher und gartenbaulicher Kulturpflanzen sowie in weitere nationale und internationale Prozesse. Ferner übernimmt die BLE nach einem fest vorgegebenen Austauschformat die Daten der Dokumentation der Sammlungsbestände und bringt diese in das Nationale Inventar zu Pflanzengenetischen Ressourcen PGRDEU ein.

Eine unter voller Beachtung der internationalen Rahmenbedingungen (Konvention über die Biologische Vielfalt und Internationaler Vertrag über Pflanzengenetische Ressourcen für Ernährung und Landwirtschaft) entwickelte Materialübertragungsvereinbarung stellt sicher, dass die zierpflanzen genetischen Ressourcen für Nutzungen in Forschung, Züchtung und Ausbildung für Landwirtschaft und Gartenbau zu einheitlichen und vereinfachten Bedingungen zur Verfügung stehen. Es wird ebenfalls geregelt, dass jede nachfolgende Weitergabe des Materials wieder durch Abschluss einer neuen Materialübertragungsvereinbarung erfolgen muss und das Material damit weiterhin zu diesen erleichterten Bedingungen für die Nutzung zur Verfügung steht. Aus diesem Grunde schließt die Materialübertragungsvereinbarung auch eine Patentierung von Produkten, die aus dem erhaltenen Material entwickelt wurden, explizit aus. Empfänger des Materials werden in der Materialübertragungsvereinbarung auch zu freiwilligen Leistungen (Spenden) zur Förderung nationaler und internationaler Maßnahmen zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung genetischer Ressourcen aufgerufen. Hierzu hat die Koordinationsstelle der Deutschen Genbank Zierpflanzen eigens ein Treuhandkonto eingerichtet.

Als wesentliches verbindendes Element wurde für die Deutsche Genbank Zierpflanzen ein eigenes Logo entwickelt, welches allen Partnern auch in den Genbanknetzwerken zur Verfügung steht. Es dient einerseits zur gemeinsamen Außendarstellung, stellt andererseits aber auch für die einzelnen Partner eine Art „Qualitätssiegel“ für die von ihnen erhaltenen Sammlungen dar.

Ausblick

Auch im internationalen Vergleich gehört die Deutsche Genbank Zierpflanzen neben der Zierpflanzen genbank der Ohio State University (OPGC 2011) in Amerika zu den ersten auf Zierpflanzen spezialisierten Genbanken überhaupt. Dies zeigt die hohe Relevanz der bislang aufgebauten Strukturen, v.a. im Hinblick auf die besondere Schwierigkeit, geeignete Strukturen, die sowohl zu den nationalen, als auch den internationalen Rahmenbedingungen kompatibel sind, zu entwickeln. Vorgaben aus dem Bereich der landwirtschaftlichen Arten können dabei nur bedingt übernommen werden.

Aufgrund des großen Artenreichtums ist der weitere Ausbau der Deutschen Genbank Zierpflanzen unbedingt weiter voranzutreiben. Hierfür sind neben den Sammlungsstrukturen verstärkt die wirtschaftliche und züchterische Relevanz der zu erhaltenden Arten zu berücksichtigen.

Strukturell konnte mit dem begonnenen Aufbau des neuen Moduls „Genbank für generativ erhaltene Arten“ (siehe Beitrag Dr. Spellerberg) beim Bundessorten ein weiterer wichtiger Fortschritt erzielt werden. Ergänzend hierzu laufen derzeit Gespräche mit relevanten Akteuren, u.a. Botanischen Gärten, um ein analoges Modul einer „Genbank für vegetativ erhaltene Arten“ zu implementieren. Daneben sollen für wirtschaftlich und züchterisch relevante Arten auch weitere gattungs-/artenspezifische Netzwerke etabliert werden, sofern hierfür geeignete Rahmenbedingungen (Sammlungsstrukturen) vorliegen.

Der große Bereich der Liebhabersammlungen wird derzeit über ein vom BMELV über die BLE gefördertes Projekt „Netzwerk Pflanzensammlungen“ bearbeitet, u.a. mit dem Ziel, die in Privatsammlungen erhaltene Vielfalt zu erfassen und deren Erhaltung langfristig abzusichern sowie mittelfristig auch eine geeignete Schnittstelle zur Deutschen Genbank Zierpflanze zu etablieren.

In der Endausbaustufe wird mit der Etablierung der Module für generativ und vegetativ vermehrte Zierpflanzenarten die Deutsche Genbank Zierpflanzen eine auch international zu beachtende Infrastruktur für die Erhaltung von genetischen Ressourcen von Zierpflanzen darstellen und durch die gemeinsamen Anstrengungen der am Netzwerk beteiligten Akteure so einen entscheidenden Beitrag für die nachhaltige Nutzung dieser Ressourcen national wie auch international leisten.

Literatur

- BMELV, 2007: Agrobiodiversität erhalten. Potenziale der Land-, Forst- und Fischereiwirtschaft erschließen und nachhaltig nutzen. Eine Strategie des BMELV für die Erhaltung und nachhaltige Nutzung der biologischen Vielfalt für die Ernährung, Land-, Forst- und Fischereiwirtschaft.
- CBD, 2011: The Convention on Biological Diversity, <http://www.cbd.int/convention/> (Besucht am 21.9.2011)
- FAO, 2010: The Second State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, Rom
- INTERNATIONAL TREATY, 2011: The International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, <http://www.itpgrfa.net/International/content/homepage/> (Besucht am 21.9.2011)
- OPGC, 2011: Ornamental Plant Germplasm Center (OPGC), Ohio State University, <http://opgc.osu.edu/> (Besucht am 17.10.2011)
- ZADI, 2001: Schriften zu Genetischen Ressourcen, Band 15: Erhaltung und nachhaltige Nutzung genetischer Ressourcen der Zierpflanzen - Tagungsband eines Symposiums vom 27. - 28. September 2000 im Arbeitnehmerzentrum in Königswinter, Zentralstelle für Agrardokumentation und -information (ZADI), Bonn

Aktuelle Entwicklungen zum Aufbau der Deutschen Genbank Zierpflanzen beim Bundessortenamt

Spellerberg, Burkhard
Bundessortenamt, Referat Sortenschutz Zier- und Forstgehölze, Osterfelddamm 80. 30627 Hannover
Telefon: 0511-9566-5731; Fax: 0511-9600; E-Mail: burkhard.spellerberg@bundessortenamt.de

DOI: 10.5073/jka.2011.433.003

Einleitung

Zum 01.09.2011 hat das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) dem Bundessortenamt (BSA) neue Aufgaben im Bereich der Erhaltung und nachhaltigen Nutzung genetischer Ressourcen übertragen. Verschiedene Tätigkeiten im Bereich der Bewahrung von genetischen Ressourcen bei samenvermehrten Zierpflanzen, der Mitwirkung in den Genbanken Rhododendron, Rose, Rebe sowie bestimmten Obstarten und die Erstellung und Führung einer Gesamtliste Obst sind nun beim Bundessortenamt angesiedelt. Bei einigen der genannten Pflanzengattungen wirkt das Bundessortenamt bereits in etablierten Genbanken mit. Vorhandene Aktivitäten wie zum Beispiel bei Obst oder Rebe sollen ausgebaut werden, bei anderen Gattungen kommen neue Aufgaben hinzu.

Im Folgenden wird über den Stand der Planungen für den Bereich der Bewahrung von genetischen Ressourcen bei Zierpflanzen informiert. Diese beinhalten den Aufbau einer beim Bundessortenamt einzurichtenden Genbank für samenvermehrte Zierpflanzen sowie weitere Aktivitäten als unterstützender Partner bei der Genbank Rhododendron und als sammlungserhaltender Partner bei der Genbank Rose.

Aufbau einer Genbank für samenvermehrte Zierpflanzen

Bei einem von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) organisierten Fachgespräch wurde am 13. Oktober 2010 über die Etablierung einer „Genbank für generativ erhaltene Arten“ als Teil der Deutschen Genbank Zierpflanzen beraten. Bei vegetativ vermehrten Zierpflanzen bestehen bereits Genbanken für die Gattungen Rhododendron und Rose. Umfangreiche vegetativ vermehrte Sortimente verschiedener Zierpflanzenarten werden in botanischen Gärten oder im Liebhaberbereich mit besonderem Aufwand bewahrt.

Für samenvermehrte Zierpflanzen besteht in Deutschland zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur eine nennenswerte Sammlung beim Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben, die so genannte „Erfurter Sammlung“. Diese besteht seit längerem unverändert aus ca. 1.700 Akzessionen von Zierpflanzen taxa, die langfristig erhalten werden und deshalb in ihrem Erhalt nicht akut gefährdet sind. Eine notwendige Erweiterung der Sammlung um weitere gefährdete Taxa ist aber insbesondere aus Kapazitätsgründen beim IPK nicht möglich. Das derzeit im Aufbau befindliche dezentrale Genbanknetzwerk Wildpflanzen für Ernährung und Landwirtschaft (WEL-Genbank), an dem verschiedene botanische Gärten beteiligt sind, soll vornehmlich die Wildformen einheimischer Nutzpflanzen erhalten. Es umfasst somit nicht schwerpunktmäßig Zierpflanzen. Weitere, jeweils wesentlich kleinere Sammlungen als im IPK, sind in gartenbaulichen Betrieben, in Botanischen Gärten, in Einrichtungen mit Vereinsstruktur und/oder bei Liebhabern vorhanden.

Um die Erhaltung genetischer Ressourcen bei samenvermehrten Zierpflanzen in Deutschland langfristig und effizient zu sichern und deren Verfügbarkeit für Forschung, Züchtung sowie gartenbauliche und landschaftsgestaltende Zwecke in Zukunft gewährleisten zu können, ist der Aufbau einer koordinierten Genbank für samenvermehrte Zierpflanzen notwendig. Diese Schlussfolgerung war ein wesentliches Ergebnis des BLE-Symposiums „Erhaltung und nachhaltige Nutzung genetischer Ressourcen von Zierpflanzen – Schritte zum weiteren Ausbau der Deutschen Genbank Zierpflanzen“ am 24. und 25. November 2009. Moderne samenvermehrte Zierpflanzenarten stellen oft einen sehr engen Genpool dar. Veränderte Klimabedingungen, das Auftreten neuer Krankheitserreger und Schädlinge sowie der Bedarf an neuen Eigenschaften machen alte Sorten und Herkünfte zu einer unverzichtbaren Quelle an Variabilität. Diese über Samen zu vermehrende Sorten („Samensorten“) dokumentieren zudem einen wesentlichen Teil unserer Gartenkultur. Im Vergleich zur Zahl der Sorten bei vegetativ vermehrten Zierpflanzenarten, ist die Zahl der „Samensorten“ sehr gering. Sie dürfte internen Schätzungen zufolge im unteren vierstelligen Bereich liegen. Einer dezentralen Erhaltung durch Liebhaber stehen oftmals mangelnde fachliche und technische Voraussetzungen für die genetische Erhaltung und Reproduktion der Sorten entgegen. Dezentrale Genbankmodelle, wie bei Rose und Rhododendron, sind für samenvermehrte Zierpflanzenarten daher weniger geeignet. Deshalb wurde entschieden, eine zentrale Genbank für samenvermehrte Zierpflanzen innerhalb der Deutschen Genbank Zierpflanzen einzurichten. Diese Genbank soll mit ausgewählten Partnern zusammenarbeiten und damit einen wesentlichen Beitrag zur nationalen *Ex-situ*-Erhaltungsstruktur von pflanzengenetischen Ressourcen in Deutschland leisten. Eine Koordinierung der Aktivitäten auf dem Gebiet der Erhaltung genetischer Ressourcen samenvermehrter Zierpflanzen in Deutschland fehlt bisher und wurde nunmehr vom BMELV an das BSA übertragen.

Zielsetzung für die Genbank samenvermehrte Zierpflanzen

- Einrichtung einer zentral betriebenen Hauptsammlung für "Samensorten" von Zierpflanzen beim BSA
- Organisation und Koordination der Zusammenarbeit mit der Deutschen Genbank Zierpflanzen (IBV der BLE) und weiteren Partnern wie IPK und WEL-Genbank
- Identifizierung gefährdeter Taxa bzw. Sammlungen und/oder Sortimente sowie Einschätzung ihrer Bedeutung
- Aufbau einer Sammlung, unter anderem durch Übernahme von Sorten aus gefährdeten Sammlungen
- Entwicklung geeigneter Methoden für die Erhaltung der Sorten
- Beschreibung und Evaluierung der Sortimente
- Zentrale Dokumentation
- Abgabe von Material in Anlehnung an internationale und nationale Genbankstandards

Weiteres Vorgehen

- Bildung einer Expertengruppe, die das BSA beim Aufbau der Genbank für samenvermehrte Zierpflanzen unterstützt
- Festlegung der Prioritäten für die Aufnahme von Arten und Sorten in die Genbank, insbesondere unter Berücksichtigung ihrer potentiellen Gefährdung

- Erschließung möglicher Quellen für Material von samenvermehrten Zierpflanzen; Sammlungsbeginn u. a. durch „Sammlungsaufrufe“ bei Liebhabern, Züchtern etc.
- Erarbeitung geeigneter Methoden für Saatgutlagerung, Sortenerhaltung, Beschreibung und Evaluierung sowie Festlegung der entsprechenden Abläufe
- Entwicklung geeigneter EDV-Programme zur Verwaltung und Dokumentation der Genbank
- Einbindung der Genbank samen vermehrter Zierpflanzen in vorhandene Datennetzwerke, u. a. in das Nationale Inventar zu Pflanzengenetischen Ressourcen in Deutschland (PGRDEU; <http://pgrdeu.genres.de/>) bzw. im Netzwerk Pflanzensammlungen bei der DGG 1822 e.V.
- Nationale und internationale Zusammenarbeit mit entsprechenden Fachkreisen

Von besonderer Bedeutung ist es, die Kriterien zur Auswahl von erhaltenswerten, samenvermehrten Zierpflanzen festzulegen. Prioritäten für die Auswahl von Arten und Sorten sollen von einer Expertengruppe festgelegt werden. Dabei sollten insbesondere folgende Aspekte Berücksichtigung finden:

- in Deutschland vorhandene bzw. traditionell genutzte Arten und Sorten
- Arten und Sorten mit potentieller züchterischer, wirtschaftlicher und wissenschaftlicher Bedeutung
- Arten und Sorten mit historischer und kultureller Bedeutung
- Arten und Sorten mit besonderen Eigenschaften (z.B. Resistenzen)

Bei der Aufnahme von Sorten in die Genbank wird der Echtheitsüberprüfung der Akzessionen (Art-/Sortenzugehörigkeit) besondere Priorität beizumessen sein.

Aktivitäten zur Bewahrung von genetischen Ressourcen bei Rhododendron und Rose

Das Bundessortenamt ist im Beirat zur Genbank Rhododendron vertreten und unterstützt hier mit Kenntnissen und Erfahrungen aus dem Bereich der Sortenschutzprüfungen bei Freilandrhododendron und Topfazalee. Für die Genbank Rose ist geplant, dass das Bundessortenamt noch in 2011 sammlungserhaltender Partner wird. Es ist vorgesehen, dass geeignete Rosensorten aus den beim Bundessortenamt erhaltenen lebenden Kollektionen von Freilandrose und Topfrosee in die Genbank übernommen und entsprechend dokumentiert werden.

Nutzung molekularer Marker in der Züchtung von Heide (*Calluna vulgaris*)

Use of molecular markers in breeding of heather (*Calluna vulgaris*)

Hohe, Annette; Behrend, Anne

Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ), Institutsteil Erfurt, Kühnhäuser Straße 101, 99189 Erfurt
Tel.: 036201 785 210; E-Mail: hohe@erfurt.igzev.de

DOI: 10.5073/jka.2011.433.004

Zusammenfassung

Zur Unterstützung der Züchtung von knospenblühender Sommerheide (*Calluna vulgaris*) wurde die Vererbung des Merkmals „Knospenblütigkeit“ in verschiedenen spaltenden Rückkreuzungspopulationen untersucht. Aufgrund der analysierten Spaltungsverhältnisse wird von einem monogen-rezessiven Erbgang ausgegangen. RAPD- und ISSR-Marker wurden zur Untersuchung der Größe des genetischen Pools der Art *C. vulgaris* verwendet, und ein Verfahren zur Identifikation sogenannter „abgeleiteter Sorten“ wurde für diese Pflanzenart angepasst. Zudem wurde nach molekularen Markern für das ökonomisch wichtige Merkmal „Blütentyp“ gesucht, die eine Selektion auf dieses Merkmal bereits im Jungpflanzenstadium ermöglichen würden. Sowohl für RAPD- als auch für AFLP-Marker wurden ausschließlich Marker für das dominante Allel „Einfachblüher“ gefunden.

Die dargestellten Ergebnisse fassen mehrere Arbeiten zur Züchtungsforschung an knospenblühender Sommerheide zusammen.

Stichwörter: AFLP, ISSR, Knospenblüher, Marker-gestützte Selektion, RAPD, Sortenidentifizierung

Abstract

In order to assist breeding of bud-flowering heather (*Calluna vulgaris*) the inheritance of the trait “bud-flowering” has been analyzed in various segregating backcross populations. From the resulting segregation ratios a monogenic recessive inheritance was deduced. RAPD- and ISSR-markers have been used for evaluation of the genetic pool of *C. vulgaris*, and a technique for identification of “essentially derived varieties” has been adapted for this species. Moreover, it has been searched for molecular markers of the economically important trait “flower type” that would allow selection already in the seedling stage. However, both RAPD as well as AFLP-markers have only been found for the dominant wild-type allele.

In the current review various publications on breeding research of bud-flowering heather are summarized.

Keywords: AFLP, bud-flowers, cultivar identification, ISSR, marker-assisted selection, RAPD

Einleitung

Calluna vulgaris zählt in Mittel- und Nordeuropa zu den wirtschaftlich wichtigsten Beet- und Balkonpflanzen für die Herbstbepflanzung (BEHR und NIEHUES, 2009). Im Vergleich zu anderen ökonomisch wichtigen Zierpflanzenkulturen ist *C. vulgaris* bisher aber noch nicht sehr intensiv züchterisch bearbeitet worden. Bisherige Züchtungsstrategien beschränken sich auf die Auslese von zufälligen Mutanten und einfache Kreuzungspläne. In mehreren aufeinanderfolgenden Forschungsprojekten wurde daher daran gearbeitet, ein systematisches Züchtungsverfahren insbesondere für die wichtige Sortengruppe der sogenannten Knospenblüher von *C. vulgaris* (Abbildung 1) zu entwickeln, wobei auch die Nutzung molekularer Marker einbezogen wurde. Molekulare Marker werden in der Pflanzenzüchtung im Wesentlichen für zwei unterschiedliche Zwecke eingesetzt: Zum einen dienen sie der Marker-gestützten Selektion („marker-assisted selection“ – MAS), zum anderen der Untersuchung der genetischen Distanz verschiedener Individuen. Beide Ziele wurden auch bei den Arbeiten mit *C. vulgaris* verfolgt. Einerseits wurde die Größe des genetischen Pools untersucht und ein Verfahren zur Identifikation sogenannter „abgeleiteter Sorten“ entwickelt. Andererseits sollten molekulare Marker für das ökonomisch wichtige Merkmal „Knospenblütigkeit“ gefunden werden, die eine Selektion auf dieses Merkmal bereits im Jungpflanzen-stadium ermöglichen.



Abb. 1 Blütentriebe der Sommerheide (*Calluna vulgaris*); links: Knospenblüher, rechts: Einfachblüher (Wildtyp)

Die Ergebnisse dieser Arbeiten werden im Folgenden zusammenfassend dargestellt. Die verschiedenen Publikationen, in denen die Ergebnisse detailliert veröffentlicht wurden, werden jeweils entsprechend zitiert.

Material und Methoden

Zu Untersuchung der Vererbung des Merkmals „Knospenblütigkeit“ wurden gezielt einzelne einfach- und knospenblütige Individuen miteinander gekreuzt und rückgekreuzt. Die genauen Kreuzungspläne sind in Borchert und Hohe (2009) dargestellt. Die Untersuchung der genetischen Distanzen unterschiedlicher Sorten erfolgte mit Hilfe von RAPD- und ISSR-Markern (Borchert et al., 2008). Zur Markierung des Merkmals „Knospenblütigkeit“ wurden sowohl RAPD- als auch AFLP-Marker eingesetzt (Borchert und Hohe, 2009; Borchert und Gawenda, 2010).

Ergebnisse

○ Vererbung der Merkmale „Knospenblütigkeit“ (Borchert und Hohe, 2009):

Die Kreuzung von Einfach- mit Knospenblüher resultiert in der Regel in einer rein einfach blühenden F1-Population. Wurden Individuen dieser F1-Generation mit dem knospenblütigen Elter zurückgekreuzt, so spaltete die resultierende Rückkreuzungspopulation in Bezug auf das Merkmal „Blütentyp“. In drei von vier untersuchten Kreuzungskombinationen betrug das Spaltungsverhältnis 1 : 1. Dies deutet auf einen monogen rezessiven Erbgang hin. Allerdings treten auch Spaltungsverhältnisse auf, die signifikant von einem 1 : 1-Verhältnis abweichen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass an der Aufprägung des Merkmals neben dem antizipierten Majorgen vermutlich noch weitere Faktoren beteiligt sind, die sich zwischen den einzelnen Sortenkombinationen unterscheiden. In einzelnen Fällen wurden F1-Pflanzen zudem mit einem Knospenblüher gekreuzt, der nicht Elter der F1 war. Auch in diesem Fall spalteten Knospenblüher in der Nachkommenschaft heraus. Dies deutet darauf hin, dass in den knospenblütigen Sorten ein- und derselbe Locus betroffen ist, da ansonsten bei einem rezessiv vererbten Merkmal der mutierte Locus komplementiert würde.

○ Analyse genetischer Distanzen (Borchert et al., 2009):

Auf der Basis von 168 RAPD- und ISSR-Markern wurden die genetischen Distanzen von 74 Genotypen von *C. vulgaris* (Sorten sowie einige Wildpflanzen) sowie 3 Genotypen von *Erica* spp. ermittelt und in einem Dendrogramm verrechnet. Die überwiegende Mehrheit der paarweisen Vergleiche wies einen Ähnlichkeitskoeffizienten (Dice) von 0,8 oder größer auf. Der genetische Pool von *C. vulgaris* ist daher als relativ eng einzustufen, insbesondere da auch in der Natur gesammelte Genotypen in Verbindung mit Zuchtsorten nur einen geringfügig kleineren Ähnlichkeitskoeffizienten aufwiesen als Zuchtsorten untereinander. Nur eine sehr geringe Anzahl von Knotenpunkten des Dendrogramms konnte statistisch abgesichert werden (bootstrapping, n=10.000). Daher scheint dieses Verfahren nicht für die Identifizierung von abgeleiteten Sorten nutzbar zu sein. Entsprechend wurde ein alternatives Verrechnungsverfahren der Ähnlichkeitskoeffizienten angewandt (Eeuwijk und Law, 2004), mit dessen Hilfe ein individuell auf den untersuchten genetischen Pool abgestimmter Grenzwert des Ähnlichkeitskoeffizienten (Dice) ermittelt wird. Dieser betrug in diesem Fall 0,865. Zur Validierung dieses Wertes wurden Sortenpaare eingesetzt, von denen bekannt war, dass sie voneinander abgeleitet bzw. dass sie züchterisch voneinander unabhängig waren. Die Ähnlichkeitskoeffizienten der voneinander abgeleiteten Sortenpaare lagen über dem genannten Grenzwert, die der unabhängigen Sortenpaare darunter oder innerhalb des Fehlerbereiches über dem Grenzwert. Anschließend wurden zwölf Sortenpaare getestet, bei denen aus unterschiedlichen Quellen eine Hypothese über deren genetischen Distanz abgeleitet werden konnte. Diese wurde für elf der zwölf Paare bestätigt.

○ Molekulare Marker für das Merkmal „Knospenblütigkeit“ (Borchert und Hohe, 2000; Borchert und Gawenda, 2010):

Mit Hilfe der bulked-segregant-analysis nach Michelmore (1991) wurden in einer spaltenden Rückkreuzungsnachkommenschaft der Sorten 'Melanie' und 'Roter Oktober' zwei gekoppelte RAPD-Marker für den Blütentyp „Einfachblüher“ identifiziert. Diese wiesen eine Größe von ca. 2,5 bzw. 1,2 kb auf. Auf Einzelpflanzenebene wurden für den kleineren Marker keine Rekombinanten gefunden, bei dem größeren Marker trat eine Rekombinante unter den Knospenblüher auf. Beide RAPD-Marker wurden sequenziert, wobei für den kleineren zwei unterschiedliche Sequenzen gewonnen wurden, was vermutlich

darauf zurückzuführen ist, dass dieser sehr eng von weiteren Banden flankiert wurde. Die Marker erwiesen sich aber nur in der Ausgangspopulation als funktional. Sowohl in einer anderen Rückkreuzungspopulation als auch in unabhängigen Sorten war das Auftreten beider Marker nicht mit dem Blütentyp gekoppelt. In einem weiteren Ansatz wurde in einer Rückkreuzungspopulation der Sorten 'Maria' und 'Boskoop' nach AFLP-Marker für den Blütentyp gesucht (Abbildung 2). Hier wurden 44 Marker für Einfachblüher und 22 Marker für Knospenblüher identifiziert. Bei allen Markern für Knospenblüher war allerdings die Präsenz der Marker in den Elternpflanzen und der F1 nicht konsistent; bei den Markern für Einfachblüher traten solche widersprüchliche Ergebnisse nicht auf. Die Marker für Knospenblütigkeit wurden daher nicht weiter untersucht. Von den Kandidaten-Markern für Einfachblüher wurden 16 auf Einzelpflanzenebene überprüft. Sieben wiesen eine Rekombinationsrate von weniger als 5% auf, einer zeigte sogar eine Rekombinationsrate von 0%. Dieses Fragment wurde sequenziert, um zu prüfen, ob es möglicherweise ein Kandidatengen abdeckt. Dies war jedoch nicht der Fall, die klonierte Sequenz lag nicht in einem kodierenden DNA-Bereich.

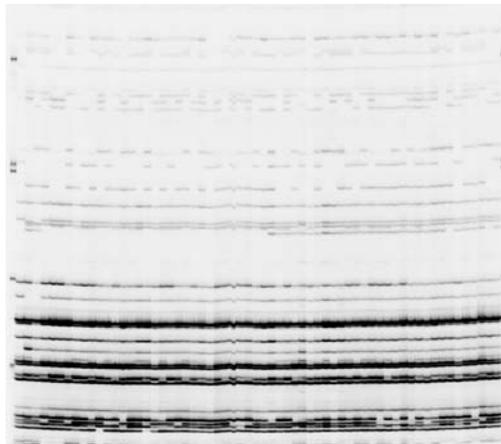


Abb. 2 Ausschnitt eines AFLP-Gels von *Calluna vulgaris* (Primer: HindIII+CAT IRDye 700 + MseI+CAC).

Diskussion

Die systematische Züchtung von knospenblühenden Genotypen bei *C. vulgaris* erfordert die Erstellung von Rückkreuzungspopulationen. In Verbindung mit einem engen genetischen Pool der Art führt dies zu geringen genetischen Distanzen zwischen den Sorten. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es dennoch möglich ist, auf der Basis der Analyse genetischer Marker abgeleitete Sorten zu identifizieren. Voraussetzung ist allerdings die Ermittlung eines spezifischen Grenzwertes für den genetischen Pool, aus dem die in Frage stehenden Sorten stammen, da dieser deutlich von einem z.B. für Rosen ermittelten Grenzwert (Vosman et al., 2004) differiert.

Die Suche nach einem molekularen Marker für das Merkmal „Knospenblütigkeit“ war nur bedingt erfolgreich. Trotz der Anwendung unterschiedlicher Methoden in zwei verschiedenen Rückkreuzungspopulationen ist es nicht gelungen, einen Marker zu finden, der mit dem Merkmal „Knospenblütigkeit“ gekoppelt ist. Allerdings wurden sowohl RAPD- als auch AFLP-Marker identifiziert, die mit dem Merkmal „Einfachblüher“ kosegregieren. Aufgrund der Menge an durchgeführten Untersuchungen wird davon ausgegangen, dass der Mangel an Markern für die „Knospenblütigkeit“ nicht zufällig sondern genetisch begründet ist, z.B. durch eine Deletion im Genom der Knospenblüher.

Rout und Mohapatra (2006) und Byrne (2007) haben ermittelt, dass nur sehr wenige Zierpflanzenzüchter Verfahren der Marker-gestützten Selektion nutzen. Hierzu trägt sicher der hohe Entwicklungsaufwand bei, der sich nicht lohnt, sofern insbesondere in den oft noch nicht sehr intensiv züchterisch bearbeiteten Kulturen des Zierpflanzenbaus auch mit konventionellen Verfahren Züchtungsfortschritte zu erzielen sind. Allerdings

nutzen auch Zierpflanzenzüchter molekulare Marker regelmäßig zur Eltern-Identifizierung und zur Sortenunterscheidung (Rout und Mohapatra, 2006). Zukünftig ist aufgrund neuer DNA-Sequenzierverfahren mit einer erheblichen Reduktion der Entwicklungskosten für molekulare Marker zu rechnen, während gleichzeitig die Verfügbarkeit von Sequenzdaten auch für wirtschaftlich weniger bedeutende Kulturen deutlich steigt. Daher kann mit einer verstärkten Anwendung molekulare Marker auch in der Zierpflanzenzüchtung gerechnet werden. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass auch bei leichter Verfügbarkeit von Sequenzdaten (bzw. dann insbesondere) nur eine planvolle und systematische Anwendung die Züchtungsarbeit tatsächlich erleichtert.

Literatur

- Behr H. C. und R. Niehues, 2009: Markt und Absatz. In: Status quo und Perspektiven des deutschen Produktionsgartenbaus. Landbauforschung, Sonderheft **330**, 69-98.
- Borchert T. und A. Hohe, 2009: Identification of molecular markers for the flower type in the ornamental crop *Calluna vulgaris*. *Euphytica* **170**, 203-213.
- Borchert T. und I. Gawenda, 2010: Development and application of high-throughput amplified fragment length polymorphism technique in *Calluna vulgaris* (Ericaceae). *Electronic Journal of Biotechnology* **13** No. 2, Issue of March 15, 2010.
- Borchert T., J. Krueger und A. Hohe, 2008: Implementation of a model for identifying Essentially Derived Varieties in vegetatively propagated *Calluna vulgaris* varieties. *BMC Genetics* **9**, 56.
- Byrne D. H., 2007: Molecular marker use in perennial plant breeding. *Acta Hort* **751**, 163-167.
- Michelmore R. W. I. Paran und R. V. Kesseli, 1991: Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9828-9832.
- Rout, G. R. und A. Mohapatra, 2006: Use of molecular markers in ornamental plants: a critical reappraisal. *Europ. J. Hort Sci.* **71**(2), 53-68.
- Vosman B., D. Visser, J. van der Voort, Smulders M und F. van Eeuwijk, 2004: The establishment of 'essential derivation' among rose varieties, using AFLP. *Theor Appl Genet* **109**, 1718-1725.

Biotechnologische Methoden für die züchterische Verbesserung von Zierpflanzen

Mibus, Heiko; Serek, Margrethe; Winkelmann, Traud
 Institut für Zierpflanzen - und Gehölzwissenschaften, Leibniz Universität Hannover,
 Herrenhäuser Straße 2, 30419 Hannover

DOI: 10.5073/jka.2011.433.005

Einleitung

Die deutsche Zierpflanzenzüchtung nimmt weltweit eine führende Rolle ein und meldet jährlich für die internationale Vermarktung eine große Anzahl von neuen Sorten an. Beim Europäischen Sortenamts sind die neu angemeldeten Zierpflanzenarten mit einem Anteil von 60% die mit Abstand größte Pflanzengruppe (Jahresbericht 2007 CPVO Community Plant Variety Office). Neben der großen Bedeutung deutscher Zierpflanzenzüchtungsunternehmen lässt sich daraus auch entnehmen, dass die Suche nach Neuheiten den Sektor bestimmt. Der große Konkurrenzdruck unter den Zierpflanzenzüchtern und die schnellen Veränderungen des Sortenspektrums am Markt erfordern neue Strategien zur Sortenentwicklung. Zur Unterstützung und Beschleunigung der klassischen Züchtung hat deshalb die Nutzung von biotechnologischen Methoden in den letzten Jahrzehnten stark an Bedeutung gewonnen.

Unter Zierpflanzen fallen viele diverse Pflanzenarten verschiedenster Familien in tausenden von Sorten. Durch diese Vielfalt ergibt sich eine ausgeprägte Heterogenität, die eine Übertragung von biotechnologischen Methoden von einer Zierpflanzenart auf eine andere und sogar die Übertragung von einer Sorte auf eine andere meist ausgesprochen schwierig und damit sehr zeitintensiv werden lässt. Idealerweise werden Methoden benötigt, die bei vielen verschiedenen Pflanzenarten und -sorten effizient

angewendet werden können, um durch schnelle Züchtung flexibel auf die sich wandelnden Marktanforderungen zu reagieren.

Die Forschung der Abteilung Zierpflanzenbau des Instituts für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften der Leibniz Universität Hannover (LUH) beschäftigt sich mit Themen zur Nacherntephysiologie und Qualität von Zierpflanzen (z. B. *Kalanchoë*, *Campanula*, Topfrosen, *Pelargonium*). Neben der Untersuchung von Alterungsprozessen bei Zierpflanzen stehen die Suche nach umweltverträglichen Haltbarkeitsmitteln und molekulargenetische Ansätze zur Verbesserung der Haltbarkeit im Vordergrund. Ein weiterer Schwerpunkt der zierpflanzenbaulichen Forschung und Lehre ist die Nutzung von In-vitro-Kulturtechniken zur Vermehrung sowie der Transformation zur Verbesserung der gartenbaulich relevanten Eigenschaften der Zierpflanzen. So wurden und werden umfangreiche Versuche zur Transformation von *Petunia*, *Pelargonium*, *Kalanchoë* sowie *Campanula* durchgeführt. Ein neuer Forschungsbereich beschäftigt sich mit der physiologischen und molekulargenetischen Aufklärung von Barrieren bei interspezifischen Kreuzungen zur Züchtung neuer Hybriden. Die meisten Forschungsprojekte werden in Kooperation mit gartenbaulichen Unternehmen durchgeführt.

In Forschung und Lehre der Abteilung Baumschule werden schwerpunktmäßig Fragen der Züchtung, Vermehrung, Physiologie und Kultur von Gehölzen und anderen gartenbaulichen Kulturen, darunter diverse Zierpflanzen, bearbeitet. Der Schwerpunkt wird in Zukunft in Richtung von Fragen zur Vermehrungsphysiologie, mit besonderem Augenmerk auf In-vitro-Kulturtechniken liegen. Die Ausstattung umfasst Freiland-, Gewächshaus-, Klimakammer- und In-vitro-Kulturf Flächen, ein molekulargenetisches und ein In-vitro-Labor, Möglichkeiten zur Durchflusszytometrie und Histologie, Substrat- und Pflanzennährstoffanalytik, sowie Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie. Forschungsschwerpunkte, die Zierpflanzen betreffen, sind die Entwicklung und Optimierung von In-vitro-Kulturtechniken, vor allem die somatische Embryogenese bei *Cyclamen persicum*, somatische Hybridisierung und „Embryo rescue“ Techniken zur Entwicklung von Arthybriden (z.B. in den Gattungen *Cyclamen* und *Helleborus*), Entwicklung von Transformationssystemen zur Untersuchung von Genfunktionen (*Cyclamen*, *Phalaenopsis*) und das Themengebiet Bodenmüdigkeit.

Im Folgenden werden Techniken und Methoden erläutert, die die Zierpflanzenzüchtung derzeit schon oder in Zukunft bereichern und effizienter gestalten, und die im Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften der LUH in Forschungsprojekten eingesetzt werden: Es sind dies interspezifische Hybridisierungen, In-vitro-Kulturtechniken, die genetische Transformation und molekulargenetische Analysen von Kandidatengen. Diese Techniken werden zunächst kurz vorgestellt, bevor anhand von aktuellen Beispielen ihres Einsatzes in unserem Institut Möglichkeiten und Begrenzungen aufgeführt werden.

Interspezifische Hybridisierungen

Viele der derzeit am Markt wichtigen Zierpflanzen sind vor längerer oder kürzerer Zeit aus Kreuzungen zwischen Arten hervorgegangen. Der Ansatz, Art- und zum Teil auch Gattungsgrenzen zu überwinden, ist nach wie vor eine treibende Kraft der Zierpflanzenzüchtung, deren Potential bei weitem noch nicht ausgeschöpft ist. Während in landwirtschaftlichen Kulturen weite Kreuzungen häufig mit dem Ziel der Übertragung einzelner wichtiger Eigenschaften aus verwandten Arten verbunden ist und wiederholte Rückkreuzungen die Regel sind, ist bei Zierpflanzen häufig bereits die primäre Hybride als neue Zierpflanze interessant. Das generelle Vorgehen bei interspezifischer Hybridisierung beginnt mit der Ermittlung von Ort und Zeit der Kreuzungsbarrieren. Dazu sind zunächst Untersuchungen zur Pollenvitalität mit Vitalitätsfärbung (z. B. Fluoreszeindiacetat nach Widholm (1972), MTT (3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide) nach Kathum und Flowers 1995) oder Pollenkeimfähigkeitstests *in vitro* geeignet, um die Fertilität des Pollenelters zu ermitteln. Gegebenenfalls sind Versuche zur Synchronisierung der Blütezeit oder zur Pollenlagerung zu empfehlen. Die Beobachtung des Pollenschlauchwachstums nach Anilinblaufärbung (detaillierte Anleitung in Winkelmann et al. 2010) unter dem Fluoreszenzmikroskop ist ein wesentlicher Schritt, um die mögliche Kreuzungsbarriere zu lokalisieren und festzustellen, ob diese präzygotisch oder postzygotisch (vor oder nach der Befruchtung) wirksam ist. Bei Barrieren, die vor der Befruchtung wirksam werden, können *In-vitro*-Bestäubungen, die sogenannte „cut-style“ oder „grafted-

style“ Methode (Van Tuyl et al. 2000) oder zum Beispiel die Verwendung von Mentorpollen (Singsit und Hanneman 1991) Anwendung finden. Ist die Befruchtung hingegen erfolgt, so lässt sich die „Embryo Rescue“ Technik einsetzen. Hierbei entwickelt sich der Embryo an der Mutterpflanze noch eine Zeitlang, wird dann aber abgenommen und *in vitro* kultiviert, um das Absterben zu verhindern, das häufig auf eine Fehlentwicklung des Endosperms zurückzuführen ist. Entscheidende Faktoren für das Gelingen in einem „Embryo Rescue“ Ansatz sind die Wahl der Elterngenotypen, die Kreuzungsrichtung und der Zeitpunkt der Entnahme der Fruchtknoten, Samenanlagen oder Embryonen (Winkelmann et al. 2010).

Ein weiterer, aufwändigerer Weg zu interspezifischen Hybriden ist der über somatische Hybridisierungen. Voraussetzung dafür ist, dass mindestens für mindestens einen der Partner ein System zur Pflanzenregeneration aus Protoplasten vorliegt. Dazu muss ein Protokoll für die Polyethylenglykol oder elektrisch vermittelte Protoplastenfusion angepasst werden. Ein weiterer Flaschenhals ergibt sich bei der Selektion der Heterofusionsprodukte, weil unserer Erfahrung nach der Einsatz von Inhibitoren nicht gut funktioniert (Meyer 2006).

Die Identifizierung der Hybriden kann frühzeitig, d.h. schon im Sämlingsstadium, mit Hilfe molekularer Marker oder mittels Durchflusszytometrie erfolgen (Meiners und Winkelmann 2011). Voraussetzung für die durchflusszytometrische Identifizierung sind DNA-Gehalte der Eltern, die sich um mindestens 20-25 % unterscheiden. Bei den DNA-Markern wurden in der Vergangenheit häufig RAPDs (random amplified polymorphic DNA) oder AFLPs (amplified fragment length polymorphism) eingesetzt, zukünftig werden sicher auch bei Zierpflanzen verstärkt Mikrosatellitenmarker oder SNPs (single nucleotide polymorphism) verwendet. Auch die Entwicklung von art- oder gattungsspezifischen Markern kann hilfreich sein (Rode et al. 2010, Prange et al. 2011). Mit Chromosomenanalysen, vor allem, wenn sie aufgrund von Fluoreszenzmarkierung die Zuordnung zu den Eltern ermöglichen (FISH = Fluorescence In Situ Hybridisation, GISH, = Genomic In Situ Hybridisation) (Raina und Rani 2001; Jiang und Gill 2006) sind weitere wichtige Erkenntnisse über die genetische Konstitution der Hybriden zu erlangen. Abschließend erfolgt in der Regel eine detaillierte Untersuchung der Morphologie, des Wachstums, der Fertilität und der gärtnerischen Kultureigenschaften.

Aktuell bearbeitete Projekte im Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften sind:

○ **Erstellung interspezifischer Nemesien-Hybriden:**

Die neuen Züchtungen von Nemesiensorten beruhen auf Kreuzungen mit der Art *Nemesia strumosa*, mit besonders großen Blüten in leuchtenden Farben. Allerdings sind diese Pflanzen gegenüber anderen Arten wie z.B. der kleinblütigen *Nemesia fruticans* weniger robust. Nemesienhybriden, die die positiven Eigenschaften der unterschiedlichen Arten vereinen, werden daher angestrebt. Durch die Arbeiten von Datson et al. (2008) wurden verschiedene IST und ETS Marker, die als Grundlage für die Erstellung eines genetischen Stammbaumes, welcher verschiedene Nemesienarten enthält, genutzt. Die von Datson et al. (2008) durchgeführten Kreuzungsexperimente und phylogenetischen Stammbäume zeigen, dass es in der Gattung *Nemesia* drei Gruppen gibt, die untereinander nicht bzw. nur bedingt kreuzbar sind. Jedoch sind die Arten der Gruppe 1 größtenteils untereinander kreuzbar (Datson und Murry 2006). Ziel des Projektes ist die Analyse und Überwindung der bei Nemesien auftretenden Kreuzungsbarrieren zur Erstellung interspezifischer Nemesienhybriden mit neuen Eigenschaften. Voraussetzung hierfür ist, dass die Befruchtungsmechanismen sowie die bei Nemesien auftretenden Kreuzungsbarrieren eingehend cytologisch und molekulargenetisch identifiziert, untersucht und charakterisiert werden. Die aus diesen Kreuzungen entstehenden Nachkommenschaften werden phänotypisch und molekulargenetisch untersucht. Des Weiteren soll an Beispielkreuzungen die Befruchtungsbiologie, d. h. der Prozess von der Bestäubung bis zur Befruchtung/Samenreife bzw. dem Abort histologisch untersucht und dokumentiert werden. Außerdem sollen die bei *Arabidopsis* an der Embryoentwicklung beteiligten Schlüsselgene bei Nemesien kloniert werden. Darauf aufbauend sollen neue Ansätze für eine stammbaumbasierende Züchtungsstrategie entwickelt bzw. In-vitro- Verfahren zur Überwindung der Kreuzungsbarrieren entwickelt und getestet werden.

○ **Erstellung interspezifischer *Helleborus*-Hybriden:**

Die Gattung *Helleborus* umfasst 22 Arten, die sechs Sektionen zugeordnet sind und sich hinsichtlich Blatt- und Blütenmorphologie, insbesondere Blütenfarbe, und der Resistenz gegenüber der Schwarzfleckenkrankheit (*Coniothyrium hellebori*) unterscheiden. Diese Merkmale sind im Hinblick auf die züchterische Weiterentwicklung der bekannten *Helleborus* Arten wie *Helleborus niger* (Christrose) und *H. x hybridus* (Lenzrose) interessant. Vorbereitend für interspezifische Hybridisierungen wurden verschiedene *Helleborus* Arten cytologisch, durchflusscytometrisch und molekulargenetisch mittels AFLPs charakterisiert. Für alle Arten konnte eine gemeinsame Chromosomenzahl von $2n=32$ ermittelt werden. Die DNA-Gehalte des Kerngenoms variierten zwischen 18,3 pg DNA/2C und 33,2 pg DNA/2C. Basierend auf 1109 AFLP Markern wurden genetische Distanzen ermittelt (Meiners et al. 2011). Mittels blütenbiologischer Untersuchungen wurden die Kreuzungsbarrieren zwischen den *Helleborus* Arten als vorwiegend postzygotisch identifiziert. Mit einem Embryo Rescue Verfahren wurden insgesamt 217 interspezifische Hybriden gewonnen, von denen 14 aus Kreuzungen zwischen Arten stammen, die unterschiedlichen *Helleborus* Sektionen zugeordnet sind (Meiners und Winkelmann 2011). Diese Hybriden wurden zum Teil in durchflusscytometrischen Analysen, zum Teil mit RAPD-Markern verifiziert. Einige dieser Hybriden wird derzeit akklimatisiert, um die Morphologie vor allem der Blüten, die Fertilität und die Kultureigenschaften zu ermitteln.

○ **Somatische Hybriden zwischen *C. persicum* und *C. coum*:**

Cyclamen persicum ist weltweit eine wirtschaftlich bedeutende Zierpflanze, die bisher nur durch Kreuzungen innerhalb der Art züchterisch bearbeitet wurde. Eine Hybridisierung mit Wildarten wäre interessant, um neue Eigenschaften, wie Blattzeichnung, Blütenduft, Krankheitsresistenz, Hitze- oder Kältetoleranz in den Genpool der Kulturcyclamen zu integrieren. Kreuzungen mit *C. coum* waren in der Vergangenheit auch unter Einbeziehung von „Embryo Rescue“-Techniken nicht erfolgreich. Daher wurde in unserer Arbeitsgruppe der Weg der somatischen Hybridisierung eingeschlagen. Zunächst wurden ausgehend von embryogenen Suspensionskulturen Protokolle für die Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten von *C. persicum* (Winkelmann et al. 2006) und *C. coum* (Prange et al. 2010) etabliert. Mit Hilfe der Polyethylenglykol (PEG)-vermittelten Protoplastenfusion gelang es erstmals, Hybridpflanzen zu regenerieren (Prange et al. 2011). Die somatischen Hybriden zeigten eine größere Ähnlichkeit zu *C. coum*. Durchflusscytometrische Messungen wiesen einen addierten DNA-Gehalt von beiden elterlichen Arten in den Hybriden nach. Chromosomenuntersuchungen ergaben, dass die *C. persicum* Chromosomen nach und nach eliminiert wurden. Derzeit werden die Hybridpflanzen *in vitro* über somatische Embryogenese verklont, bevor ihre Eigenschaften im Gewächshaus sowie die Konstitution der Plasmakomponenten (Chloroplasten und Mitochondrien) untersucht werden.

***In-vitro*-Vermehrung**

Die *In-vitro*-Kultur wird gerade bei Zierpflanzen als eine Methode der Vermehrung genutzt (Winkelmann et al. 2006b). Zur Unterstützung der Zierpflanzenzüchtung sind *In-vitro*-Techniken in den folgenden Anwendungen realisiert, bzw. denkbar (Tabelle 1). Die Züchtung von Zierpflanzen profitiert seit langem davon, dass es mit Hilfe der *In-vitro*-Kultur gelingt, krankheitsfreies Pflanzenmaterial zu erstellen, zu vermehren und zu lagern. Diese Möglichkeiten haben demzufolge Einzug in fast alle größeren Zierpflanzenzüchtungsunternehmen gehalten, sei es durch Betreiben von eigenen *In-vitro*-Laboratorien, sei es durch Inanspruchnahme von Dienstleistungen. Viele Publikationen existieren für diverse Zierpflanzenarten, problematisch ist jedoch, dass es stets sehr ausgeprägte genotypische Unterschiede in der *In-vitro*-Reaktion gibt, die nach wie vor nicht verstanden sind.

Forschungsbedarf gibt es vor allem bei neuen Zierpflanzen bei der Entwicklung von Vermehrungs- und Regenerationsverfahren, bei der Entwicklung von etwas schwierigeren Techniken, wie Haploidentechniken oder Protoplastenregeneration und -fusion sowie *In-vitro*-Mutagenese. Hier sind Kooperationen mit Forschungseinrichtungen gefragt. Zudem ist es für die weitere Nutzung der *In-vitro*-Kultur für Vermehrung und Züchtung wichtig, die Kulturverfahren weiterzuentwickeln, um qualitativ hochwertige Pflanzen kostengünstig mit möglichst wenig Einsatz von menschlicher Arbeitskraft zu produzieren. Darunter wären

zum Beispiel die temporären Immersionskulturen zu nennen, die technisch und kulturtechnisch noch verbessert werden müssen. Weitere nach wie vor aktuelle Forschungsfragen ergeben sich aus der Problematik von endophytischen Mikroorganismen und der Vermeidung von somaklonaler Variation.

Tab. 1 Anwendungsbereiche pflanzlicher *In-vitro*-Kulturtechniken (verändert nach Pierik 1997)

<i>In-vitro</i> -Kulturtechnik	Anwendungsbereiche
Kultur von zygotischen Embryonen/ <i>Embryo rescue</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Überwindung von Kreuzungsbarrieren, Verhinderung des Absterbens von Embryonen
Kultur von Samen	<ul style="list-style-type: none"> • Verkürzung des Züchtungszyklus • Sterile Aussaat von Orchideen ohne Mykorrhiza
Meristemkultur/Sprossspitzenkultur	<ul style="list-style-type: none"> • Verkürzung des Züchtungszyklus • Eliminierung von Pathogenen, v. a. Viren und Bakterien • Etablierung von <i>In-vitro</i>-Kulturen bei Pflanzenarten, die schwierig zu regenerieren sind, axillare Sprossvermehrung • Kryokonservierung (Langzeitlagerung, gekühlt) • Erhaltung von Schichtchimären
Adventivsprossregeneration	<ul style="list-style-type: none"> • <i>In-vitro</i>-Mutagenese • Pflanzenvermehrung • Entmischung von Chimären • Genetische Transformation • -Mutagenese
<i>Embryogene Kallus</i> - und Suspensionskulturen	<ul style="list-style-type: none"> • Massenvermehrung über anschließende somatische Embryogenese • Material zur Isolierung von Protoplasten • Gewinnung krankheitsfreien Materials • Selektion von Zelllinien mit spezifischen Eigenschaften • Genetische Transformation • <i>In-vitro</i>-Mutagenese
Antheren-/Mikrosporen-Kultur	<ul style="list-style-type: none"> • Gewinnung von Haploiden und/oder homozygoten Doppelhaploiden • Reduktion der Ploidiestufe zur Vereinfachung der Züchtung • Genetische Transformation
Samenanlagen-/Ovarien-Kultur	<ul style="list-style-type: none"> • Gewinnung von Haploiden und/oder Homozygoten • Reduktion der Ploidiestufe zur Vereinfachung der Züchtung • Verhinderung des Absterbens von Embryonen • <i>In-vitro</i>-Fertilisation • Überwindung von Kreuzungsbarrieren (s.o.: <i>Embryo rescue</i>)
Protoplasten	<ul style="list-style-type: none"> • Genetische Transformation • Somatische Hybridisierung • Gewinnung von Cybriden

o Somatische Embryogenese bei *C. persicum*:

Die somatische Embryogenese ist für *Cyclamen persicum* etabliert und stellt eine Alternative zu der bisherigen, sehr aufwändigen Vermehrung über Samen dar. Die Nutzung der somatischen Embryogenese für die kommerzielle Massenvermehrung ist aufgrund von teilweise auftretenden Entwicklungsstörungen und einer asynchronen Differenzierung immer noch begrenzt. Das System wird allerdings schon zur Verklonung von Eltern von F₁-Hybriden genutzt und war die Basis für die somatischen Hybridisierungen (s.o.: 1.c). Während in der Vergangenheit vor allem „Trial and error“ Ansätze verfolgt wurden, um Verbesserungen in der *In-vitro*-Kultur zu erreichen, zielen jüngere Studien auf das bessere Verständnis der ablaufenden Prozesse ab und die daraus resultierenden Möglichkeiten der Systemoptimierung. Transkriptomische (Rensing et al. 2005, Hönemann et al. 2010) und proteomische Studien (Winkelmann et al. 2006c, Rode et al. 2011a, Rode et al. 2011b) wurden durchgeführt, um die Physiologie der Embryogenese bei *Cyclamen* zu analysieren. Unser Ansatz besteht darin, die zygotischen Embryonen als Vorbild oder ideales Proteinmuster anzusehen und mit den somatischen Embryonen zu vergleichen, um Unterschiede aufzudecken.

Die Proteinaufreinigung wurde dazu für die untersuchten Gewebe optimiert und die darauffolgende zweidimensionale Auftrennung mittels IEF-SDS PAGE resultierte in hochauflösenden Gelen mit über 1000 Proteinspots (Rode 2011). Eine neue Software - GelMap - wurde zur Etablierung und Präsentation von digitalen Proteomreferenzkarten entwickelt (www.gelmap.de, Rode et al. 2011c). In die Referenzkarte von somatischen und zygotischen Embryonen wurden 247 mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteinspots annotiert. Der Vergleich der Proteome von somatischen und zygotischen Embryonen zeigte u.a., dass der Glykolyse eine Schlüsselfunktion in der Entwicklung der somatischen und zygotischen Embryonen zukam, somatische Embryonen erhöhten Stressbedingungen ausgesetzt waren und in zygotischen Embryonen Speicherproteine stärker abundant waren. Verkürzte Formen des Enzyms Enolase wurden als Kandidaten für eine neue Gruppe von Speicherproteinen in Samen identifiziert. In einer zweiten proteomischen Studie wurde die Entwicklung während der somatischen Embryogenese ausgehend von embryogenem Kallus bis zu torpedoförmigen somatischen Embryonen untersucht. Hierbei wurde eine essentielle Rolle des Ubiquitin/26S-Proteasom Stoffwechselweges für Entwicklung von globulären somatischen Embryonen aus Kallus und von globulären zu torpedoförmigen Embryonen gefunden. Die Behandlung mit Abscisinsäure sowie die Kultivierung von somatischen Embryonen auf Nährmedium mit hohem Saccharosegehalt resultierten in einer verbesserten Reifung und Qualität von somatischen Embryonen (Rode et al. 2011b).

o **Virusfreimachung bei *Dahlia*:**

Als ein weiteres Beispiel für aktuelle Projekte im Bereich *In-vitro*-Kulturtechniken sei eine Masterarbeit genannt, die das Ziel hat, die Viruseliminierung aus *Dahlia* Sorten durch Sprossspitzenkultur und die Entwicklung von schnellen Nachweisverfahren für verschiedene RNA-Viren und einem DNA-Virus zu erreichen.

Genetische Transformation

Für einen erfolgreichen und stabilen Transfer einer Ziel DNA in eine pflanzliche Zelle werden maßgeblich zwei Methoden eingesetzt: Das „Particle bombardment“, d.h. die mechanische Übertragung mittels Gold- oder Wolfram-Partikeln, die mit hohem Druck auf das pflanzliche Gewebe geschossen werden, und der *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transfer einer T-DNA. Da die Agrobakterium vermittelte Transformation bei den meisten Zierpflanzenarten zu einer höheren Transformationsrate führt, wird diese Methode jedoch weitaus häufiger eingesetzt. Die genetische Transformation kann zur gezielten Verbesserung von bestimmten Charakteristika bei Zierpflanzen eingesetzt werden (Debener und Winkelmann 2010). Meist kommt diese Methode zum Einsatz, wenn bestimmte Eigenschaften nicht in dem entsprechenden Genpool vorkommen oder nur durch zeitaufwendige Kreuzungsprogramme eingekreuzt werden könnten. Zur Veränderung des Phänotyps können entsprechende Kandidatengene überexprimiert oder aber ausgeschaltet werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet der genetischen Transformation ist die Funktionsanalyse von bestimmten Genen. Auch wenn diese Analysen ausschließlich für die Forschung eingesetzt werden, können sie wichtige Informationen für die Selektion mit molekularen Markern enthalten und damit die Zierpflanzenzüchtung unterstützen. Durch die aus der großen Sorten- und Artenvielfalt entstehende Heterogenität bei Zierpflanzen ist die Übertragung von Transformationsprotokollen von einer Zierpflanzenart zu einer anderen und sogar die Übertragung von einer Sorte auf eine andere meist ausgesprochen schwierig und damit sehr zeitintensiv. Folglich besteht ein wichtiges Ziel darin, Transformationsmethoden zu entwickeln, die bei vielen verschiedenen Pflanzenarten und -sorten effizient angewendet werden können.

In den letzten Jahren wurde die Vermarktung von transgenen Pflanzen mit einem Selektionsgen, und dabei insbesondere mit Antibiotikaresistenzgenen, in der Öffentlichkeit sehr kritisch diskutiert, sodass die Anmeldung von transgenen Pflanzen immer weiter erschwert wurde. Besonders verstärkt wurde dies durch den Erlass der EU-Richtlinie 2001/18/EG (EU-Richtlinie 2001/18/EG), die darauf abzielt, den Gebrauch von Antibiotika-Resistenzgenen mit möglichen schädlichen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und Umwelt auszuschließen. Obwohl keine wissenschaftliche Grundlage für diese Bedenken ermittelt werden konnten, würde die Herstellung markerfreier, transgener Pflanzen zweifellos zu einer höheren

Verbraucherakzeptanz führen (De Vetten et al. 2003). Aus diesem Grund besteht ein weiteres Ziel darin, die für die Transformation verwendeten Selektionsgene zu eliminieren.

○ **Entwicklung von Technologien zur effizienten Herstellung markerfreier Zierpflanzen:**

Der größte Anteil der heute genutzten Transformationsmethoden basiert auf bakteriellen Genen, das sind zum einen Selektionsgene (z.B. Antibiotikaresistenz), aber auch Gene zur anschließenden Eliminierung von unerwünschten Sequenzen (z.B. Rekombinasen). Die in den letzten Jahren durchgeführten großen Genomprojekte lieferten Informationen, die Strategien zur Optimierung von Genen bzw. dessen Codonstrukturen für dikotyle Pflanzenarten ermöglichen. Damit stehen neue Werkzeuge zur Verfügung, mit denen bakterielle Gene für den pflanzlichen Organismus optimiert werden können, sodass eine bessere Verträglichkeit und eine erhöhte Aktivität im pflanzlichen Zielorganismus zu erreichen ist. Die mit Hilfe dieser neuen Methode optimierten Gene werden in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen für die Transformation von Zierpflanzenarten getestet. Ein weiteres Ziel des Projektes besteht darin, die für die Transformation verwendeten optimierten Selektionsgene mittels eines codonoptimierten, sequenzspezifischen Rekombinationssystems zu eliminieren. Weiterhin sollen Strategien zur Optimierung von binären Vektoren verfolgt werden, die eine höhere Plasmidstabilität und damit eine bessere Transformationsrate und Reproduzierbarkeit von Transformationen bei Pflanzen ermöglichen. Zielsetzung des mit Züchtern durchgeführten ZIM (Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand) Projektes ist die Entwicklung von neuen Transformationstechnologien zur effizienten Herstellung von transgenen Zierpflanzen, die frei von Selektionsgenen sind. Des Weiteren kann durch die Eliminierung der Selektionsgene ein großer Beitrag zur breiteren Akzeptanz von gentechnisch veränderten Zierpflanzen in der Öffentlichkeit erbracht werden.

○ **Verbesserung der Blütenhaltbarkeit:**

Bei vielen Zierpflanzenarten werden die Blütenseneszenz und die Blütenabscission durch das gasförmige Phytohormon Ethylen induziert (Woltering und Van Doorn 1988). Zierpflanzenarten, die besonders stark auf Ethylen reagieren, sind z.B. *Campanula*, *Kalanchoë*, *Pelargonium*, *Delphinium*, *Dianthus* und *Petunia*. Bis heute konnte jedoch bei keiner dieser untersuchten Pflanzenarten eine Ethyleninsensitivität beobachtet werden, sodass nur eine genetische Transformation zu dieser Eigenschaft führt. In bereits abgeschlossenen Projekten wurde in Kooperation mit der Universität Kopenhagen und verschiedenen Zierpflanzenzüchtern das Gen eines mutierten Ethylenrezeptors (*etr1-1*) aus *Arabidopsis* mit einer Agrobakterium vermittelter Transformation auf verschiedene *Kalanchoë*, *Oncidium* und *Odontoglossum*-Hybriden sowie *Campanula* Arten übertragen (Sriskandarajah et al. 2007, 2008; Sanikhani et al. 2008, Raffener et al. 2009). Durch die dominante Ausprägung des Gens *etr1-1* konnten bei beiden Pflanzenarten transgene Linien selektiert werden, die eine Ethyleninsensitivität der Blüten zeigten. Bei *Campanula carpatica* 'Blue Uniform' zeigten einige transgene Genotypen auch nach 27 Tagen bei 1,5 ppm Ethylen keine Blütenseneszenz (Sriskandarajah et al. 2007). Da das Ethylen als Phytohormon einen entscheidenden Einfluss auf viele physiologische Prozesse der Pflanzen hat, würde eine Ethyleninsensitivität in der gesamten transgenen Pflanze zu negativen morphologischen Veränderungen führen (z.B. Inhibierung der Wurzelentwicklung). Um diese Seiteneffekte auszuschließen und die Ethyleninsensitivität auf das Blütengewebe zu beschränken, kam ein blütenspezifischer Promoter (*fbp1*) aus der Petunie, der vor das *etr1-1* Gen kloniert wurde, zum Einsatz. Damit gelang es, eine hohe Blütenspezifität des Merkmals der Ethyleninsensitivität zu erreichen (Sriskandarajah et al. 2007; Sanikhani et al. 2008). Durch Kreuzungsversuche konnte eine stabile Vererbung der blütenspezifischen Ethyleninsensitivität bis zur T₄ nachgewiesen werden. Durch das Einkreuzen des neuen Merkmals in unterschiedliche *Kalanchoë* Wildformen (z. B. *K. campanulata* und *K. laciniata*) konnte die Funktion des Gens *etr1-1* und des Promotors *fbp1* in unterschiedlichen genetischen Hintergründen nachgewiesen werden.

○ **Beeinflussung des Habitus:**

Durch die immer restriktiveren Zulassungsverfahren für Wachstumsregulatoren wird die Produktion von kompakten Zierpflanzen immer schwieriger. Auch ein züchterischer Ansatz mit dem Ziel kompakt wachsender Sorten ist meist schwierig, da dieses Merkmal sehr häufig mit einer Schwachwüchsigkeit und mit kleinen Blüten korreliert ist. In den letzten Jahren konnten die molekulargenetischen Mechanismen des Längenwachstums bei Modellpflanzen immer weiter aufgeklärt werden. Damit wurde es möglich, durch eine gezielte genetische Modifikationen die Gibberellinsynthese und damit das Längenwachstum zu beeinflussen. In einem Doktorandenprojekt wurde das Gen der *GA₂oxidase* (*GA₂ox*) unter einem konstitutiven oder stängelspezifischen Promoter mittels Agrobakterium vermittelter Transformation auf *Kalanchoe* und *Petunia* übertragen. Das damit hochregulierte Enzym *GA₂ox* führt in den transgenen Linien zu einer Deaktivierung der biologisch aktiven Form *GA₃* und damit zu einer Reduktion des Längenwachstums (Stavang et al., 2005, 2007). Transgene Linien mit einem konstitutiven Promoter zeigen jedoch diverse Seiteneffekte, wie zum Beispiel eine verzögerte Blüteninduktion, kleine Blüten und Blätter und eine allgemein schwache Wüchsigkeit. Jedoch konnten durch den Einsatz eines stängelspezifischen Promotors aus *Pisum sativum* die Seiteneffekte weitgehend unterdrückt werden, sodass eine spezifische Wirkung der *GA₂oxidase* in der Zellstreckungsphase der Internodien erreicht wurde. Aufgrund von zuvor durchgeführten Testtransformationen mit unterschiedlichen Promotoren in Kombination mit Markergenen (*GUS* und *GFP*) konnte die Organspezifität des modifizierten *PAL1* Promoters für die Zielorganismen *Petunia* und *Kalanchoe* untersucht und nachgewiesen werden.

○ **Beeinflussung der Reaktion auf abiotischen Stress (Kühletoleranz):**

Abiotischer Stress (z.B. Kühlestress) führt bei der Produktion von Zierpflanzen häufig zu Qualitätseinbußen, zu einer Verlängerung der Kulturzeit und/oder zu hohen Ausfallquoten, die die Wirtschaftlichkeit der Kultur in Frage stellen. Pflanzen sind in der Lage, sich an niedrige Temperaturen anzupassen und können so notwendige biochemische Prozesse aufrechterhalten. Eine solche physiologische Anpassung hat zum Beispiel die Veränderungen der Zellmembranen oder die Modifizierung des Wasserhaushaltes zur Folge (Pearce 1999). Diese als Kühleadaptation bezeichnete Reaktion der Pflanzen ist sowohl auf biochemischer als auch auf der Ebene der Genregulation bei Modellpflanzen untersucht worden. So konnten in den letzten Jahren Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden, die es der Pflanze ermöglichen, spezifisch auf abiotischen Stress (z.B. niedrige Temperaturen) zu antworten. Die meisten dieser Transkriptionsfaktoren konnten in die bisher ausschließlich in Pflanzen nachgewiesene *AP2/ERF* Genfamilie eingeordnet werden. Diese Genfamilie ist eine große Gruppe von Genen, die für Proteine kodieren, die im Promotorbereich binden (cis Element) und als Aktivatoren die Transkription eines Gens stimulieren oder als Repressoren die Expression unterbinden können. Benannt wurde die *AP2/ERF* Genfamilie nach dem zuerst isolierten Protein mit zwei repetitiven AP2 Domänen, dem APETALA2 Protein aus *Arabidopsis thaliana* (Jofuku et al. 1994). Aus Ethephon behandelten Tabakblättern wurden die ersten Gene, die nur für eine AP2 Domäne codieren, isoliert. Sie werden daher als Ethylene Responsive Element Binding Proteins (EREBP) bzw. als Ethylene Responsive Element Binding Factors (ERF) bezeichnet (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995). Ziel des Projektes (Verbundprojekte „Terminproduktion von Zierpflanzen in Gewächshäusern (Kühletoleranz)“, WeGa Netzwerk) ist es, an der Modellpflanze *Petunia* *AP2/ERF* Transkriptionsfaktoren unter Einfluss von niedrigen Temperaturen zu untersuchen und anschließend die Expression von selektierten Kandidatengenen durch eine Transformation zu verstärken oder auszuschalten. Die *AP2/ERF* homologen Transkriptionsfaktoren wurden mittels Analysen in EST Datenbanken (z.B. NCBI) selektiert, kloniert und sequenziert. In laufenden Funktionsanalysen werden alle isolierten *AP2/ERF* Transkriptionsfaktoren mittels Virus Induced Gene Silencing (VIGS) (Cheng et al. 2005) bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Nach diesem Funktionsscreening der *AP2/ERF* Transkriptions-faktoren werden selektierte Transformationsvektoren unter der Kontrolle eines konstitutiven 35S Promotors überexprimiert oder durch einen RNAi Ansatz mittels Transformation einer cDNA palindrom Sequenz gesilenced. Diese transgenen Petunien stehen dann für weitere Kühletoleranz-Versuche in Kooperation mit den Projektteilnehmern zur Verfügung. Die so selektierten transgenen Petunien mit einer erhöhten Kühletoleranz werden anschließend auf ihre gartenbaulichen Eigenschaften getestet.

○ **Grundlegende Untersuchung von Genfunktionen:**

Zur Zeit werden *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformationssysteme für *Cyclamen persicum* und *Phalaenopsis* Hybriden entwickelt. Diese sollen dazu genutzt werden, durch Überexpression bzw. Herabregulierung über RNAi-Ansätze die Funktion von Genen zu studieren. Bei *C. persicum* werden dies Gene sein, die in der somatischen Embryogenese eine Schlüsselrolle einnehmen, die zur Zeit in proteomischen Studien identifiziert werden (s.o.: 2.a). Bei *Phalaenopsis* wäre das Transformationssystem nötig, um Gene, die den Blütezeitpunkt in Modellpflanzen steuern, auf ihre Funktion in *Phalaenopsis* zu untersuchen.

Molekulargenetische Analysen von Kandidatengen

In den letzten Jahren konnte die Funktion vieler Gene und damit die molekulargenetischen Mechanismen diverser Eigenschaften (z.B. Blüteninduktion, Wurzelinduktion und Blütenmorphologie) bei Modellpflanzen (insb. *Arabidopsis*) aufgeklärt werden. Hingegen konnten bei Zierpflanzen durch das breite Artenspektrum und nur eingeschränkte Genom- bzw. Sequenzinformationen nur wenige molekulargenetische Zusammenhänge untersucht und aufgeklärt werden. Die stetig wachsenden Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung mit Modellpflanzen können jedoch bei der Analyse von gärtnerisch und pflanzenzüchterisch relevanten Merkmalen bei Zierpflanzenarten genutzt werden, sodass eine Aufklärung bestimmter physiologischer Eigenschaften beschleunigt werden kann. Diese auf die Zierpflanzen zu übertragenden Erkenntnisse können dann zur Sortencharakterisierung und zur gezielten Selektion bei der Züchtung neuer Sorten eingesetzt werden.

○ **Thermoperiodische Reaktion bei *Petunia*:**

Temperaturregelstrategien finden seit vielen Jahren in der konventionellen Zierpflanzenproduktion erfolgreiche Anwendung bei der Reduzierung des unerwünschten Streckungswachstums. Bei der Analyse der thermoperiodischen Inhibierung des Streckungswachstums von *Pisum sativum* konnte nachgewiesen werden, dass die Transkriptionsregulierung der *GA2oxidase*, die zur Deaktivierung der biologisch aktiven Gibberelline führt, eine Schlüsselrolle spielt (Stavang et al., 2005, 2007). Zur Aufklärung der molekulargenetischen Mechanismen der thermoperiodischen Inhibierung des Streckungswachstums bei Zierpflanzen wurden bei *Petunia* vier bisher unbekannte *GA2oxidase* Gene kloniert und analysiert. Die Expressionsanalysen des *PhGA2ox2* Gens zeigten, dass die relative *PhGA2ox2* Transkriptkonzentration in den Sprossspitzen bei *P. hybrida* durch eine kurzzeitige Temperaturabsenkung mit einer Verzögerung um das 8-fache anstieg. Die Ergebnisse weisen auf eine temperaturabhängige Expression des *PhGA2ox2* Gens hin. Die bei *P. hybrida* durch eine Temperaturabsenkung bei Dunkelheit hervorgerufene Hemmung des Streckungswachstums könnte daher vermutlich auf eine reduzierte Konzentration bioaktiver GAs infolge der erhöhten relativen *PhGA2ox2* Expression zurückgeführt werden. Da die *GA2oxidasen* durch eine Multigenfamilie codiert werden, besteht das momentane Ziel, weitere *GA2oxidasen* auf ihre Transkription und Funktion bei unterschiedlichen Umweltbedingungen zu analysieren.

○ **Blatt- und Blüten-Abscission bei Rosen:**

Ethylen zeigt bei Topfrosen viele Effekte, die zu einer Verringerung der Nacherntequalität führen: zum Beispiel das Abwerfen von Blättern, die Blütenseneszenz und den Verlust von Knospen und Blüten. Um ethyleninduzierte Gene zu isolieren wurde eine Differential Display RT-PCR bei ethylenbehandelten Topfrosen durchgeführt. Insgesamt konnten 88 hochregulierte und 72 herunterregulierte Gene kloniert werden. Von 17 hochregulierten cDNA Fragmenten wurde die Expression in unterschiedlichen Gewebebereichen der Blattstiele und Blütenstiele analysiert (Ahmadi et al. 2008). Bei den dann folgenden Arbeiten wurde ein ethyleninduziertes, laccasehomologes Gen, das als *RhLAC* bezeichnet wurde, selektiert. Diese *RhLAC* wird bereits wenige Stunden nach einer Ethylenapplikation in der Abscissionszone hochreguliert. Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz dieses Gens zeigt eine Homologie von 58% zu einer möglichen Laccase aus *Zea mays* und eine Homologie von 56% zu der Laccase 15 aus *Arabidopsis thaliana* (Ahmadi et al. 2008). Um die Funktion der Laccase zu charakterisieren, wurde die Translation des *RhLAC*-homologen Gens bei *Nicotiana benthamiana* mittels „Virus-Induced Gene Silencing“ (VIGS) unterdrückt. In Pflanzen mit

unterdrücktem *RhLAC* Gen kam es zur Vergilbung und schließlich zum Absterben der Blätter, vergleichbar mit den Symptomen von ethylenbehandelten Kontrollpflanzen. Um den genetischen Einfluss der Ethylensensitivität auf die Blatt- und Knospenabscission zu analysieren, wurden unterschiedliche F₁ Nachkommenschaften untersucht, sodass Genotypen mit geringer und hoher Ethylensensitivität selektiert werden konnten (Ahmadi et al. 2009). Transkriptionsanalysen verschiedener Ethylenrezeptor-Gene (*RhETRI/3*) und Ethylen-Signal-Transduktions-Gene (*RhCTR1/2*) konnten nicht mit der Ethylensensitivität der untersuchten Genotypen korreliert werden. Hingegen konnte die ethyleninduzierte Expression der Laccase (*RhLAC*) in allen untersuchten Genotypen mit der Ethylensensitivität korreliert werden (Ahmadi et al. 2009).

o Blütenfüllung bei Rosen:

Wichtige morphologische Eigenschaften bei Rosen sind die Blütenfarbe, die Blütenform und die Blütenfüllung. Eine erhöhte Anzahl von Petalen geht immer mit einer Reduzierung der Antheren einher, sodass ein homeotischer Wechsel von Antheren zu Petalen bei den gefüllten Blütenformen angenommen werden kann. Innerhalb der letzten 20 Jahre konnte die Blütenorganentwicklung bei den Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* (Bowman et al. 1991) und *Antirrhinum majus* (Coen et al. 1990; Schwarz-Sommer et al. 1990) auf molekulargenetischer Ebene aufgeklärt werden. Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte eine Klassifizierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren (MADS box Gene) in Meristem- und Organidentitätsgenen erfolgen und das ABC(DE)-Modell abgeleitet werden.

Die meisten Organidentitätsgene (B-, C- and E- Funktionsgene) konnten bei Wildrosen (*Rosa rugosa* Thumb. Ex Murray) bereits kloniert werden (Chmelnitsky et al. 2003; Matsumoto und Kitahara 2005). Bis vor kurzen gab es jedoch keine Informationen zu den A-Funktionsgenen (*Apetala1* und *Fruitfull*) bei der Rose, sodass die A-Funktionsgene (*RhAPI-1*, *RhAPI-2*, und *RhFUL*) kloniert und dessen Expressionsprofil in unterschiedlichen Blütentypen analysiert wurden. Damit konnten, entsprechend der Transkriptionsmuster bei anderen Pflanzenarten, eine exklusive Expression der Gene *RhAPI-1* und *RhAPI-2* in Sepalen und Pedalen nachgewiesen werden. Hingegen konnten die Transkripte des Gens *RhFUL* nur in den Sepalen nachgewiesen werden (Mibus et al. 2011). Zur Untersuchung von unterschiedlichen Blütenformen wurden die Organidentitätsgene A-, B- und C- Funktionsgene mittels quantitativer Expressionsanalysen in den Blütenorganen untersucht. Das Expressionsmuster der B-Funktionsgene zeigte keinen Unterschied zwischen der gefüllten und ungefüllten Blüte. Der Vergleich der Expressionsmuster der C- und A- Funktionsgene zeigte jedoch im zentralen Bereich des Blütenmeristems der gefüllten Blüten eine unterdrückte Expression der Gene *RhC1* und *RhC2* und eine Erhöhung der *RhAPI-1*, *RhAPI-2* und *RhFUL* Transkripte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Unterdrückung der C-Funktionsgene zur Erhöhung der Petalenanzahl führt (MIBUS et al. 2011).

Danksagung

Die Autoren danken den folgenden Fördermittelgebern sehr für die finanzielle Unterstützung der Forschungsprojekte: Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (im Rahmen von ProInno und ZIM) Bundesministerium für Landwirtschaft und Verbraucherschutz (über BLE) und Bundesministerium für Bildung und Forschung.

Literatur

- Ahmadi, N., H. Mibus und M. Serek, 2008: Isolation of an ethylene induced putative nucleotide laccase in miniature roses (*Rosa hybrida* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* 27:320-330
- Ahmadi, N., H. Mibus und M. Serek, 2009: Characterization of ethylene-induced organ abscission in F1 breeding lines of miniature roses (*Rosa hybrida* L.). *Postharvest Biology and Technology* 27 (4):320-330
- Bowman J.L., Smyth D.R., und E.M. Meyerowitz, 1991: Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development*. 112:1-20
- Chen, J.C., Jiang, C.Z. und M.S. Reid, 2005: Silencing a prohibitin alters plant development and senescence. *Plant J.* 44:16-24
- Chmelnitsky I., Khayat E., und N. Zieslin, 2003: Involvement of RAG, a rose homologue of AGAMOUS, in phyllody development of *Rosa hybrida* cv. Motrea. *Plant Growth Regulation* 39:63-66

- CPVO, 2007: Annual report. Community Plan Variety office. <http://www.cpvo.europa.eu/main/de/home/dokumente-und-veroeffentlichungen/jahresbericht>
- Coen E.S., Romero J.M., Doyle S., Elliot R., Murphy G. und R. Carpenter, 1990: Floricaula: A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63: 1311-1322
- Datson, P.M. und B.G. Murray, 2006: Pollination systems, hybridization barriers and meiotic chromosome behaviour in *Nemesia* hybrids. *Euphytica*, 151:173-185
- Datson, P.M.; Murray, B.G. und K.E. Steiner, 2008: Climate and the evolution of annual / perennial life histories in *Nemesia* (Scrophulariaceae). *Pl. Syst. Evol.* 270:39-57
- Debener, T. und T. Winkelmann, 2010: Ornamentals. S. 369-391 in: Kempken, F und C. Jung (Hrsg.): Genetic Modification of Plants, Vol. 64 Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg
- De Vetten N., Wolters A.-M., Raemakers K., van der Meer I., ter Stege R., Heeres E., Heeres P., und R. Visser, 2003: A transformation method for obtaining marker-free plants of across-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nature Biotechnology*, 21:439-442
- EU- Richtlinie 2001/18/EG : Über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates. http://www.bfr.bund.de/cm/208/richtlinie_2001_18_eg_ueber_die_absichtliche_freisetzung.pdf
- Hönemann, C., Richardt, S., Krüger, K., Zimmer, A.D., Hohe, A. und S.A. Rensing, 2010: Large impact of the apoplast on somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* offers possibilities for improved developmental control in vitro. *BMC Plant Biol* 10:77
- Jiang, J. und B.S. Gill, 2006: Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057-1068
- Jofuku, K.D., den Boer, B.G.W., Van Montagu, M. und J.K. Okamoto, 1994: Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *The Plant Cell* 6:1211-1225
- Khatum, S. und T.J. Flowers, 1995: The estimation of pollen viability in rice. *J. Exp. Bot.* 46:151-154
- Matsumoto S. und K. Kitahara, 2005: MADS-box genes in rose: Expression analysis of *Agamous*, *Pistillata3* and *Sepallata* homologue genes in the green rose. *Acta Hort.* 690:203-210
- Meiners, J. und T. Winkelmann, 2011: Evaluation of reproductive barriers and realisation of interspecific hybridisations depending on the genetic distances between species in the genus *Helleborus*. *Plant Biol.* (submitted)
- Meiners, J., Debener, T., Schweizer, G. und T. Winkelmann, 2011: Analysis of the taxonomic subdivision within the genus *Helleborus* by nuclear DNA content and genome-wide DNA markers. *Scientia Horticulturae* 128:38-47
- Meyer, L., 2006: Somatische Hybridisierungen zwischen Vertretern der Gattungen *Petunia* und *Calibrachoa*. Dissertation, Leibniz Universität Hannover
- Mibus H., Heckl D. und M. Serek, 2011: Cloning and Characterization of Three *APETALA1/FRUITFULL*-like Genes in Different Flower Types of *Rosa x hybrida* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 30 (3):272-285
- Ohme-Takagi, M. und H. Shinshi, 1995: Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell* 7:173-182
- Pearce, R.S. 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation* 29:47-76
- Pierik, R.L.M. 1997: In Vitro Culture of Higher Plants. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht
- Prange, A.N.S., Serek, M., Bartsch, M. und T. Winkelmann, 2010: Efficient and stable regeneration from protoplasts of *Cyclamen coum* Miller via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 101:171-182
- Prange, A.N.S., Bartsch, M., Meiners, J., Serek, M. und T. Winkelmann, 2011: Interspecific somatic hybrids between *Cyclamen persicum* and *C. coum*, two sexually incompatible species. *Plant Cell Rep.* (submitted)
- Raffeiner, B., Serek, M., und T. Winkelmann, 2009: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Oncidium* and *Odontoglossum* orchid species with the ethylene receptor mutant gene *etr1-1*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 98:125-134
- Raina, S.N. und V. Rani, 2001: GISH technology in plant genome research. *Methods in Cell Science* 23:83-104
- Rensing, S.A., Lang, D., Schumann, E., Reski, R. und A. Hohe, 2005: EST sequencing from embryogenic *Cyclamen persicum* cell cultures identifies a high proportion of transcripts homologous to plant genes involved in somatic embryogenesis. *J. Plant Growth Regul.* 24:102-115
- Rode, C., 2011: A proteomic dissection of embryogenesis in *Cyclamen persicum*. Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Rode, C., Winkelmann, T., Meyer, L. und T. Debener, 2010: The ethylene 2 receptor gene as a robust molecular marker for intergeneric somatic hybrids between *Petunia* and *Calibrachoa*. *Plant Breed.* 129:448-453
- Rode, C., Gallien, S., Heintz, D., van Dorsselaer, A., Braun, H.-P. und T. Winkelmann, 2011a: Enolases: Storage compounds in seeds? Evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Mol Biol* 75:305-319

- Rode, C., Lindhorst, K., Braun, H.P. und T. Winkelmann, 2011b: From callus to embryo - a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum* Mill. *Planta* (submitted)
- Rode, C., Senkler, M., Klodmann, J., Winkelmann, T. und H.-P. Braun, 2011c: GelMap – A novel software tool for building and presenting proteome reference maps. *Journal of Proteomics* 74:2214-2219
- Sanikhani M., H. Mibus, B.M. Stummann und M. Serek 2008: *Kalanchoe blossfeldiana* plants expressing the *Arabidopsis* *etr1-1* allele show reduced ethylene sensitivity. *Plant Cell Rep.* 27:729-737
- Schwarz-Sommer Z.S., Huijser P., Nacken W., Saedeler H., und H. Sommer, 1990: Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250: 931-936
- Singsit, C. und R.E. Hanneman, 1991: Rescuing abortive inter-EBN potato hybrids through double pollination and embryo culture. *Plant Cell Rep.* 9:475-478
- Sriskandarajah, S., H. Mibus und M. Serek, 2007: Transgenic *Campanula carpatica* plants with reduced ethylene sensitivity showing specific expression of *etr1-1* in flowers and buds. *Plant Cell Rep.* 26: 805-813
- Sriskandarajah, S., H. Mibus und M. Serek, 2008: Regeneration and transformation of adult plants of four campanula species. *Plant Cell Rep.* 27:1713-1720
- Stavang, J.A., Lindgard, B., Eernten, A., Lid, S.E., Moe, R. und J.E. Olsen, 2005: Thermoperiodic stem elongation involves transcriptional regulation of gibberellin deactivation in pea. *Plant Physiology* 138:2344-2353
- Stavang, J.A., Juntilla, O., Moe, R. und J.E. Olsen, 2007: Differential temperature regulation of GA metabolism in light and darkness in pea. *Journal of Experimental Botany* 58 (11):3061-3069
- Van Tuyl J.M., Van Dijken A., Chi H.S., Lim K.B., Vilmoes S. und B.C.E. Van Kronenburg, 2000: Breakthroughs in interspecific hybridisation of lily. *Acta Hort.* 508:83-88
- Widholm, J., 1972: The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.* 47:189-194
- Winkelmann, T., Specht, J. und M. Serek, 2006a: Efficient plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86:337-347
- Winkelmann, T., Geier, T. und W. Preil, 2006b: Commercial in vitro plant production in Germany in 1985-2004. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86:319-327
- Winkelmann, T., Heintz, D., van Dorsselaer, A., Serek, M. und H.-P. Braun, 2006c: Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta* 224:508-519
- Winkelmann, T., Doil, A., Reinhardt, S. und A. Ewald, 2010: Embryo rescue. S. 79-95 in: Davey, M. und P. Anthony (Eds.): *Plant Cell Culture – Essential Methods*. Wiley VCH Weinheim
- Woltering, E. J. und W. G. Van Doorn, 1988: Role of Ethylene in Senescence of Petals Morphological and Taxonomical Relationships. *Journal of Experimental Botany*, 39:1605-1616

Methodische Ansätze zur Verbesserung der Trockenstresstoleranz durch markergestützte Selektion

Enhancing drought stress tolerance by marker assisted selection procedures

Ordon, Frank; Seddig, Sylvia; Bartelmann, Anne; Balko, Christiane
Julius Kühn-Institut (JKI), Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz,
Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg
Tel.: ++49 3946 47-602; E-Mail: Frank.ordon@jki.bund.de

DOI: 10.5073/jka.2011.433.006

Zusammenfassung

Die Trockenstresstoleranz von Kulturpflanzen tritt aufgrund des Klimawandels zunehmend in den pflanzenzüchterischen Fokus. Eine sichere Selektion anhand des Phänotyps erfordert kontrollierte Bedingungen, ist sehr arbeitsintensiv und damit nur schwer in den praktischen Zuchtbetrieb zu integrieren. Aus diesem Grund sind molekulare Marker von besonderer Bedeutung im Hinblick auf eine Verbesserung der Trockenstresstoleranz. Möglichkeiten der Entwicklung und Nutzung molekularer Marker werden aufgezeigt.

Stichwörter: Trockenstresstoleranz, Molekulare Marker, markergestützte Selektion

Abstract

Tolerance to drought stress has gained evident importance due to climate change. For an efficient phenotypic selection for drought stress tolerance controlled conditions are needed and besides this reliable phenotypic selection is quite laborious and time consuming. Therefore, molecular markers are of special importance with respect to enhancing drought stress tolerance. Possibilities for the development and use of molecular markers are briefly reviewed.

Keywords: drought stress tolerance, molecular markers, marker assisted selection

Einleitung

Für Deutschland werden als Folge des Klimawandels mildere und feuchtere Winter bzw. trockenere und wärmere Frühlings- und Sommermonate prognostiziert. Da am Anfang jedweder pflanzlichen Produktion das Saat- bzw. Pflanzgut steht, kommt der Pflanzenzüchtung im Hinblick auf die Anpassung unserer Kulturarten an den Klimawandel eine besondere Bedeutung zu. Stärker als bisher tritt dabei eine Verbesserung der Trockenstresstoleranz in den pflanzenzüchterischen Fokus.

Pflanzen reagieren mit komplexen Anpassungsmechanismen auf Trockenstress. Dazu gehört zum Beispiel die Verlagerung des Blühzeitpunktes in Abhängigkeit des Auftretens von Trockenheit („escape“, Siddique et al. 2001). Andere Merkmale, die diese Anpassung bedingen, sind z. B. das Wasseraufnahmevermögen durch die Wurzel, das Wasserhaltevermögen in den Zellen, die Wasserabgabe durch die Stomata. Im Rahmen dieser Anpassungsprozesse produzieren Wurzeln Moleküle, welche eine Wasseraufnahme aus immer trockener werdenden Böden ermöglichen, Zellen entgiften reaktive Sauerstoffradikale, welche während der Dehydratation entstehen, und produzieren Moleküle, die zu einer osmotischen Adaption führen (Ashraf und Foolad 2007, Pennisi 2008).

An diesen komplexen Vorgängen, die die Trockenstresstoleranz bedingen, ist dementsprechend eine Vielzahl von Genen beteiligt (z. B. Cativelli et al. 2008), wodurch die Selektion erschwert wird. Darüber hinaus gestaltet sich eine sichere Selektion auf Trockenstresstoleranz anhand des Phänotyps neben der Komplexität des Merkmals selbst durch die dementsprechend vielfältigen Wechselwirkungen mit den Umweltbedingungen schwierig, welche den Selektionserfolg (R), der in seiner einfachsten Form als das Produkt aus dem Selektionsdifferential (SD) und der Heritabilität (h^2), d. h. dem Anteil der genotypischen Varianz an der phänotypischen Varianz, definiert ist, einschränken. Molekulare Marker können daher zu einer effektiveren Selektion auf Trockenstresstoleranz beitragen, da sie bei hinreichend enger Kopplung einen sicheren Rückschluss vom Genotyp auf den Phänotyp, unabhängig von den herrschenden Umweltbedingungen, erlauben.

Molekulare Marker Techniken

War die Selektion bis in die 1990er Jahre im wesentlichen auf den Phänotyp, d. h. das Erscheinungsbild, beschränkt, so finden seit dieser Zeit verstärkt molekulare Techniken, welche im Wesentlichen auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) beruhen, im Rahmen markergestützter Selektionsverfahren Eingang in die praktische Pflanzenzüchtung. Entsprechende Marker erlauben, wenn sie hinreichend eng mit dem Zielgen gekoppelt sind, oder auf Sequenzunterschieden im Gen selbst beruhen, eine sichere, umweltunabhängige Selektion auf DNA- bzw. RNA-Ebene für Majorgene bzw. Quantitative Trait Loci (QTL) in frühen Entwicklungsstadien (vgl. Ordon 2008). Während die Identifikation von Markern bis vor Kurzem auf die simultane Analyse weniger Marker (z. B. SSRs) in bi-parentalen Populationen beschränkt war, erlauben heute molekulare Markertechniken wie die Diversity Array Technology (DArTs, Wenzl et al. 2004) oder die Verfügbarkeit einer Vielzahl von Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), die z. B. im Hochdurchsatzverfahren mittels des Illumina GoldenGateAssays nachgewiesen werden können (Close et al. 2009), die Nutzung genomweiter assoziationsgenetischer Verfahren in der Pflanzenzüchtung (Waugh et al. 2009) bzw. genomischer Selektionsverfahren (Heffner et al. 2009).

Durch neue Sequenzierungstechniken (z. B. Munroe und Harris 2010) haben sich bzw. werden sich die Kosten für die Sequenzierung von 1Mb von ca. 10000 Dollar mittels Sanger Sequenzierung über 1000 Dollar mittels 454-Sequenzierung bis auf ca. 1 Dollar reduzieren (Delseny et al. 2010, Deschamps und Campbell 2009). Diese Kostenreduktion ermöglicht zukünftig die umfangreiche Resequenzierung kompletter Genome unserer Kulturarten und damit eine gezielte Selektion auf allelischer Ebene (vgl. Ordon 2011).

Möglichkeiten der markergestützten Selektion auf Trockenstresstoleranz

Voraussetzung für die Entwicklung molekularer Marker ist zunächst eine verlässliche Phänotypisierung, welche eine reproduzierbare Erfassung der Trockenstresstoleranz erlaubt. Hierfür eignen sich einerseits Gefäßversuche unter kontrollierten Bedingungen bzw. im Optimalfall automatisierte Hochdurchsatz-Phänotypisierungsplattformen (Schurr 2009). Unter dem Gesichtspunkt der Praxisrelevanz können andererseits auch Rain-out Shelter Versuche unter semikontrollierten Freilandbedingungen zum Einsatz kommen. Sind entsprechende phänotypische Daten zur Trockenstresstoleranz vorhanden, z. B. Unterschiede im Chlorophyllgehalt (Arunyanark et al. 2008), der Chlorophyllfluoreszenz (Oukarroum et al. 2009), der Biomasseproduktion etc., so gilt es basierend auf molekularen Markerkarten (s. o.), Genomregionen zu identifizieren, die für diese Merkmalsunterschiede verantwortlich sind. Dies kann einerseits mittels klassischer QTL-Analyse in bi-parentalen Populationen erfolgen, andererseits heute, aufgrund der zu erzielenden Markerdichte, mittels genomweiter assoziationsgenetischer Verfahren, bei denen eine möglichst wenig strukturierte Population verschiedener Genotypen einer Kulturart phänotypisiert und genotypisiert wird. So konnten beispielsweise in der Gerste sowohl mittels klassischer QTL-Analysen als auch mittels genomweiter assoziationsgenetischer Verfahren QTL für Trockenstresstoleranz nachgewiesen werden (Comadran et al. 2008).

Darüber hinaus erfolgte inzwischen insbesondere in Modellpflanzen die Identifikation einer Vielzahl von Genen, welche an der Trockenstresstoleranz beteiligt sind. Eine Übersicht über diese Gene und ihre Funktion geben z. B. Cattivelli et al. (2008), Friedt und Link (2007), Bhatnagar-Mathur et al. (2007). Sind entsprechende Gene bekannt, kann gezielt nach wirkungsvolleren Allelen, z. B. in Genbankkollektionen, gesucht werden, und diese in adaptierte Genotypen mittels klassischer Rückkreuzungsverfahren, aber auch gentechnischer Methoden (Park et al. 2009), eingelagert werden. Variabilität in der Trockenstresstoleranz kann jedoch auch durch unterschiedliche Expressionsniveaus bzw. -zeitpunkte beteiligter Gene bedingt sein (Talame et al. 2007). Entsprechende Unterschiede konnten beispielsweise in eigenen qPCR-Arbeiten bei der Kartoffel nachgewiesen werden (Ordon et al. 2011).

Schon heute steht eine Vielzahl verschiedener Methoden zur Verfügung, welche es erlauben das Phänomen der Trockenstresstoleranz auf der Ebene der DNA bzw. RNA aufzuklären und züchterisch zu bearbeiten. Daneben gewinnen in der pflanzenzüchterischen Forschung zunehmend Verfahren der Metabolomanalyse an Bedeutung (Ferne und Schauer 2008) - auch im Hinblick auf die Verbesserung der Trockenstresstoleranz (Padi et al. 2009).

Ausblick

Der Pflanzenzüchtung stehen heute effektive molekulare Markertechniken, eine ständig zunehmende Sequenzinformation sowie leistungsfähige Methoden der Transkriptom- und Metabolomanalyse zur Verfügung, welche es erlauben in zunehmendem Maße Gene bzw. genetische Netzwerke zu identifizieren. Eine Kenntnis entsprechender Gene erlaubt eine zunehmende Verlagerung der Züchtung vom Phänotyp auf den Genotyp d. h. auf die DNA- bzw. RNA-Ebene und wird zukünftig eine allelbasierte Selektion ermöglichen. Die Pflanzenzüchtung wird damit in die Lage versetzt, schneller und gezielter auf die zukünftigen Herausforderungen, d.h. eine Verbesserung der Trockenstresstoleranz, zu reagieren.

Literatur

- Arunyanark, A., S. Jogloy, C. Akkasaeng, N. Vorasoot, T. Kesmla, R.C. Nageswara Rao, G.C. Wright und A. Patanothai, 2008: Chlorophyll Stability is an Indicator of Drought Tolerance in Peanut. *J. Agronomy & Crop Science* **194**, 119-125.
- Ashraf, M. und M.R. Foolad, 2007: Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* **59**, 206–216.
- Bhatnagar-Mathur, P., V. Vadez und K.K. Sharma, 2008: Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Rep* **27**, 411-424.
- Cattivelli, L., F. Rizza, F. Badeck, E. Mazzucotelli, A.M. Mastrangelo, E. Francia, C. Mare, A. Tondelli und A.M. Stanca, 2008: Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research* **105**, 1-14.
- Close, T.J., P.R. Bhat, S. Lonardi, (2009) Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics* **10**, 582 doi:10.1186/147-2164-10-582.
- Comadran, J., J.R. Russel, F.A. van Eeuwijk, S. Ceccarelli, S. Grando, M. Baum, A.M. Stanca, N. Peccioni, A.M. Mastrangelo, T. Akar, A.Al.Yassin, A. Benbelkacem, W. Choumane, H. Ouabbou, R. Dahan, J. Bort, J.L. Araus, A. Pswarayi, I. Romagosa, C.A. Hackett und W.T.B. Thomas, 2008: Mapping adaptation of barley to droughted environments. *Euphytica* **161**, 35-45.
- Delseny, M., B. Han und Y.I. Hsing, 2010: High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution. *Plant Science* **179**, 407-422.
- Deschamps, S. und M.A. Campbell, 2009: Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery. *Mol Breeding* **25**, 553-570.
- Fernie, A.R. und N. Schauer, 2008: Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? *Trends in Genetics* **25**, 39-48.
- Friedt, W. und K. Link, 2007: Ansätze der Züchtung auf Stresstoleranz. *Vorträge Pflanzenzüchtung* **72**, 69-77.
- Heffner, E. L., M. E. Sorrells, und J. L. Jannink, 2009: Genomic selection for crop improvement. *Crop Science* **49**, 1-12.
- Munroe, D.J. und J.R. Harris, 2010: Third-generation sequencing fireworks at Marco Island. *Nature Biotechnology* **28**, 426-428.
- Ordon, F., 2008: Pflanzenzüchterische Möglichkeiten der Anpassung von Nutzpflanzen an zukünftige Produktionsbedingungen. In: *Pflanzenproduktion im Wandel – Wandel im Pflanzenschutz*. A. von Tiedemann, R. Heitefuss, F. Feldmann (Hrsg.). *Spectrum Phytomedizin*: 90-102.
- Ordon, F., 2011: Visionen der Pflanzenzüchtung zur Ertragssteigerung, -sicherung und Eröffnung neuer Verwertungsperspektiven. http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/LW2025/FrankOrden.pdf?__blob=publicationFile
- Ordon, F., A. Bartelmann, S. Seddig, und A. Habekuss, 2011: Pflanzenzüchterische Anpassung von Kulturpflanzen an zukünftige Produktionsbedingungen. *Forschungsreport (im Druck)*.
- Oukarroum, A., G. Schanker, und R.J. Strasser, 2009: Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiologia Plantarum* **137**, 188–199.
- Papdi, C., M.P. Joseph, I.P. Salamo, 2009: Genetic technologies for the identification of plant genes controlling environmental stress responses. *Functional Plant Biology* **36**, 696-720.
- Park, T.H., V.G.A.A. Vleeshouwers, E. Jacobsen, E. van der Vossen und R.G.F. Visser, 2009 Molecular breeding for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.): a perspective of cisgenesis. *Plant Breeding* **128**, 109-117.
- Pennisi, E., 2008: Plant genetics: The blue revolution, drop by drop, gene by gene. *Science* **320**, 171-173.
- Schurr, U., 2009: Merkmalsanalyse: Hochdurchsatz –Phänotypisierung. *Vorträge Pflanzenzüchtung* **81**, 95.
- Siddique, K.H.M., K.L. Regan, D. Tennant, und B.D. Thomson, 2001: Water use and water use efficiency of cool season grain legumes in low rainfall Mediterranean-type environments. *European Journal of Agronomy* **15**, 267-280.
- Talame, V., N.Z. Ozturk, H.J. Bohnert, und R. Tuberosa, 2007: Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *J Exp Botany* **58**, 229-240.
- Waugh, R., J.L. Jannink, G.J. Muehlbauer und L. Ramsay, 2009: The emergence of whole genome association scans in barley. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 218-222.
- Wenzl, P., J. Carling, D. Kudrna, D. Jaccoud, E. Huttner, A. Kleinbartsch, und A. Kilian, 2004: Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 9915-9920.

Entwicklung von Screening-Verfahren zur Bewertung der Trockenstresstoleranz von Zierpflanzen

Development of a reliable screening strategy for the evaluation of drought stress tolerance in ornamental species

Boehm, Robert¹; Krato, Theresa²; Dohm, Andrea¹; Hendriks, Ludger²

¹ Klemm & Sohn GmbH, Hanfäcker 10, 70378 Stuttgart

² Forschungsanstalt Geisenheim, Zierpflanzenbau, von Lade-Strasse 1, 65366 Geisenheim
Tel.: ++49-711-9532559; Fax: ++49-711-9532536; E-Mail: r.boehm@selectaklemm.de

DOI: 10.5073/jka.2011.433.007

Zusammenfassung

Pflegeleichte, stresstolerante Zierpflanzenarten werden vom Verbraucher und vom Handel in steigendem Umfang nachgefragt. Unter Federführung der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP) und gefördert aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) wurde daher ein Kooperationsprojekt zwischen praxisnah arbeitenden Forschungseinrichtungen und privaten Zierpflanzenzüchtungsbetrieben durchgeführt. Ziel war die Entwicklung und Evaluierung effizienter, praxistauglicher Screening-Verfahren zur Bewertung von Zierpflanzen-Genotypen im Hinblick auf den Grad ihrer Trockenstresstoleranz. Dazu wurde ein Drei-Stufen-Konzept entwickelt, in dem Pflanzen (1) in einer Kleinparzellenanlage bei zwei Feuchtestufen herangezogen wurden, (2) nach ausreichender Anpassung an das unterschiedliche Wasserangebot für Dehydrierungsexperimente entnommen und in Klimakammern einer Austrocknung unterworfen werden und (3) nach ausreichender Anzuchtdauer in Spezialcontainer verpflanzt und im Freiland bei zwei Feuchtestufen kontinuierlich auf Trockenstresssymptome bonitiert wurden. Insgesamt hat das Projekt durch intensive Beschäftigung mit dem komplexen Thema Trockenstresstoleranz und besonders durch den intensiven persönlichen Austausch zu einem großen Erkenntnis- und Erfahrungsgewinn bei allen beteiligten Projektpartnern geführt. Durch die hohe Umwelt-Interaktion und eine intensive züchterische Bearbeitung scheint der Einfluss der genetischen Komponente eher gering zu sein. Er wird überlagert durch die jeweiligen Kultur- und Produktionsbedingungen in den Betrieben. Dadurch kommt dem Kultivateur eine ähnlich wichtige Rolle wie dem Züchter bei der Ausgestaltung des verkaufsfertigen Produktes zu. Das hohe Ausmaß der Komplexität von Trockenstresstoleranz macht es zudem schwierig, diese Eigenschaft über einfach erfassbare physiologische Marker (z.B. Blattoberflächentemperatur, Stomatamanagement) sicher zu charakterisieren.

Stichwörter: Zierpflanzen, Trockenstresstoleranz, Versuchsstand, Dehydrierung, Petunien, Impatiens

Abstract

There is a growing demand for low-maintenance, stress tolerant ornamental species by consumers and retail. Under the general management of the Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP) and granted by the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection, a cooperation project between applied research institutions and private breeding companies was carried out. Its aim was the development and evaluation of efficient and practical screening procedures for the evaluation of ornamental genotypes with regard to the degree of drought stress tolerance. For this, a three-stage concept was developed, in which plants have been (1) cultivated in a small-lot greenhouse facility under two different watering conditions, (2) used for dehydration experiments after sufficient adaptation to the different watering conditions and (3) planted into special outside container, cultivated in open space under two different watering conditions and evaluated continuously for drought stress symptoms. In conclusion, by an intense engagement of the cooperation partner with the complex topic of drought stress tolerance and especially by the intense personal exchange of experiences, the project resulted in a high increase of competencies and knowledge of all cooperation partners. Given a high environmental interaction as well as an intense breeding effort, the impact of the genetic constitution of an ornamental genotype seems to be only

small. He is superposed by actual cultivation- and production conditions at the breeding companies. Therefore, the production staff plays an equal important role as the breeder for the realization of the marketable end product. Additionally, the high degree of complexity of drought stress tolerance makes it difficult to reliably characterize drought stress tolerance by simple physiological markers like leaf surface temperature or stoma management.

Keywords: Ornamental plant, drought stress tolerance, experimental station, dehydration, Petunia, Impatiens

Einleitung

Ästhetische und produktionstechnische Eigenschaften zählten neben der Widerstandsfähigkeit gegenüber Krankheiten und Schädlingen über viele Jahre zu den dominierenden Zielen der Zierpflanzenzüchtung. Der Klimawandel, branchenfremde Vermarktungswege und nicht zuletzt das veränderte Konsumentenverhalten hat die Liste der vorrangigen Zuchtziele inzwischen um die Toleranz gegenüber abiotischem Stress erweitert. Für Freilandzierpflanzen besitzt die Trockenstresstoleranz in diesem Zusammenhang besondere Bedeutung. Es werden daher zunehmend Sorten nachgefragt, die durch eine höhere Robustheit und Toleranz Trockenstressphasen besser überstehen. Zur Selektion auf dieses Merkmal ist allerdings eine reproduzierbare Methodik zur Charakterisierung der Trockentoleranz erforderlich. Ein Verbund aus Zierpflanzenzüchtern und anwendungsorientiert arbeitenden Forschungseinrichtungen des Pflanzenbaues und der Messtechnik entwickelte im Rahmen einer von der GFP koordinierten interdisziplinären Zusammenarbeit Screening- und Messverfahren zur Charakterisierung verschiedener Zierpflanzenarten hinsichtlich ihrer Trockentoleranz. Hierbei war es das Ziel, den Züchtern ein robustes und praxistaugliches Verfahren zur verlässlichen Charakterisierung von Zierpflanzen hinsichtlich Trocken-toleranz an die Hand zu geben. Für Zierpflanzen liegen in der Literatur bisher weder Protokolle zur Gestaltung von Dehydrierungs-experimenten noch zur Bonitur der Welkeintensität vor.

Material und Methoden

Für die Untersuchungen wurden drei verschiedene Zierpflanzenarten ausgewählt: Petunien, Neu-Guinea Impatiens sowie Begonien. Von den beteiligten Industriepartnern (Ernst Benary Samenzucht GmbH, Hann. Münden; Kientzler GmbH, Gensingen; Klemm & Sohn GmbH, Stuttgart; Syngenta Seeds B.V., Hillscheid) wurden verschiedene Sorten für die Versuche zur Verfügung gestellt. Diese waren bereits durch Beobachtungen der Züchter hinsichtlich Trockenstresstoleranz vorcharakterisiert.

Für die Versuche wurden von den Industriepartnern bewurzelte Jungpflanzen geliefert. Die weitere Anzucht erfolgte im Gewächshaus unter zwei Bewässerungsvarianten (praxisübliche Bewässerung und unter intensiven Trockenstressbedingungen). Pro Sorte und Bewässerungsvariante wurden 60 Töpfe angezogen. Die Messung des Wassergehaltes in den Töpfen erfolgte entweder über Tensiometer, Bodenfeuchtesensoren (Tensiometer) oder durch Wiegen der Töpfe. Am Ende der Vorkultur wurde das Frischgewicht der oberirdischen Pflanzenteile durch Wiegen ermittelt. Nach beschriebener Anzucht unter Gewächshausbedingungen wurden acht Töpfe je Sorte und Behandlung entnommen und einem Dehydrierungsprozess unter definierten Bedingungen (22°C, 30-50% rel. Luftfeuchtigkeit, Beleuchtungsdauer 16h, Beleuchtungsstärke 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ausgesetzt. Neben der Saugspannung des Substrates und dem Systemgewicht (Topf+Substrat+Pflanze) wurde der Wasserhaushalt der Pflanzen durch tägliches Messen der Transpirationsrate ermittelt. Zusätzlich erfolgte eine Welkebonitur anhand einer Bilderskala von 1 (ohne Symptome) bis 9 (alle Pflanzenteile stark welk).

Für einen gemeinsamen Ringversuch zur Validierung der erzielten Ergebnisse unter Praxisbedingungen wurden von den Industriepartnern insgesamt 9 Sorten zur Verfügung gestellt (Tabelle 1), deren Verhalten bereits in vorhergehenden Versuchen charakterisiert worden war. Zur Standardisierung der Versuchsbedingungen wurden je 30 Pflanzen nach einer gemeinsamen Anzucht in Geisenheim auf die Projektpartner aufgeteilt und neben den Bewässerungs- und Düngungsstrategien auch die jeweiligen Bonituren und Messungen verabredet. Die übrigen Kulturmaßnahmen und die Klimatisierung der Versuchsgewächshäuser erfolgten standortspezifisch. Die Bewässerung erfolgte über Untersetzer mit einem Fassungsvermögen von etwa 200 Milliliter. Je 10 Pflanzen (Kontrolle) wurden ausreichend bewässert, die übrigen 40 Pflanzen

(Stressvariante) erst nach starker Austrocknung des Substrates (etwa -500 hPa, circa 20 % der max. Wasserkapazität). Zur Ermittlung des Systemgewichtes wurden 4 repräsentative Pflanzen pro Parzelle ausgewählt und deren Gewichtsverlauf täglich überwacht. Die Nährstoffversorgung erfolgte über eine Bewässerungsdüngung mit 0,8 g/l für Impatiens und 1,2 g/l für Petunien unter Verwendung von Ferty 3-Mega. Zur Charakterisierung der Trockenstresstoleranz wurden die Bewässerungshäufigkeit notiert und im Rahmen einer Abschlussbonitur (nach 6 Wochen) die Pflanzenschäden (Nekrosen 1-9), die Frischmassenreduktion durch Trockenstress sowie die Anzahl der Blüten aufgenommen.

Tab. 1 Im Ringversuch bei den Züchtern verwendete Pflanzensorten

Pflanzenart	Sorte	Herkunft
Impatiens	Timor	Kientzler
Impatiens	i-0588-3	Syngenta
Impatiens	K06-6321-5	Syngenta
Impatiens	Salmon Pink	Selecta Klemm
Impatiens	Cerise Frost	Selecta Klemm
Petunia	Dark Violet	Selecta Klemm
Petunia	Lilac Dark vein	Selecta Klemm
Petunia	Veranda Salmon	Kientzler
Petunia	Veranda White	Kientzler
Petunia	Odyssey	Selecta Klemm
Petunia	Hot Rose Morn	Selecta Klemm

Ergebnisse und Diskussion

o **Entwicklung eines dreistufigen Screening-Konzeptes zur sicheren Charakterisierung von Zierpflanzenarten hinsichtlich Trockenstresstoleranz:**

Im Zuge des Projektes wurde ein Drei-Stufen-Konzept zum Screening von Zierpflanzenarten hinsichtlich Trockenstresstoleranz erarbeitet und getestet. Ziel war die Identifizierung trockenstresstoleranter Genotypen.

In der ersten Stufe des Screeningkonzeptes wurden die bei zwei Feuchtestufen herangezogenen Pflanzen hinsichtlich der Ertrags- und Qualitätsbeeinflussung durch Trockenstress mittels Frischmassenbestimmung und bildanalytischer Verfahren erfasst.

In der zweiten Stufe wurden die Genotypen in Klimakammern einem definierten Austrocknungsprozess unterzogen und die Geschwindigkeit des Welkeverlaufes sowie das Regenerationsvermögen nach Wiederbewässerung als charakteristische Parameter ermittelt.

Die dritte Stufe diente der Evaluierung der in den vorangegangenen Stufen gewonnenen Bewertungen der Genotypen. Hierbei wurde geprüft, ob die unter Gewächshaus- und Klimakammerbedingungen gewonnenen Erkenntnisse zur Trockenstresstoleranz mit dem Verhalten der Genotypen unter Freilandbedingungen korrespondieren.

o **Entwicklung einer Kleinparzellenanlage zur Anzucht des Pflanzenmaterials unter verschiedenen Trockenstressintensitäten:**

Im ersten Schritt dieses Teilprojektes wurde versucht, die Ebbe- und Flut-Kleinparzellenanlage der Forschungsanstalt Geisenheim als Prüfstand für eine automatische Applikation von Trockenstress zu nutzen. Das Vorhaben scheiterte am begrenzten Einsatzbereich der derzeit auf dem Markt verfügbaren Tensiometer. In nachfolgenden Untersuchungen wurden die auf der Messung der Wärmekapazität basierende

Bodenfeuchtesensoren Tensiomark geprüft. In Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Versuchsansteller musste jedoch festgestellt werden, dass auch dieser Fühlertyp bislang keine verlässlichen Daten im Bereich hoher Wasserspannung liefert. In der Folge wurde eine gravimetrische Bewässerungssteuerung entwickelt, bei der 8 Referenzpflanzen pro Parzelle täglich gewogen und bei Unterschreitung eines bestimmten Bewässerungsschwellenwertes einem etwa 8-10-minütigen Anstauvorgang ausgesetzt werden. Unter diesen Bedingungen entstehen Wasserangebotsprofile wie sie in Abbildung 1A dargestellt sind. Ein besonderes Problem bei diesem Konzept stellte die Wiederbefeuchtung der Substrate nach starker Austrocknung und die im Versuchsverlauf zunehmende Heterogenität der Bestände infolge unterschiedlicher Wasseraufnahme dar. Durch die Verwendung von Untersetzern mit definiertem Volumen konnte die Wasserzufuhr optimiert werden. In Abbildung 1B ist der Feuchteverlauf bei diesem Verfahren dargestellt. Wegen seiner Einfachheit wurde dieses Verfahren in den späteren Ringversuchen von allen teilnehmenden Projektpartnern verwendet.

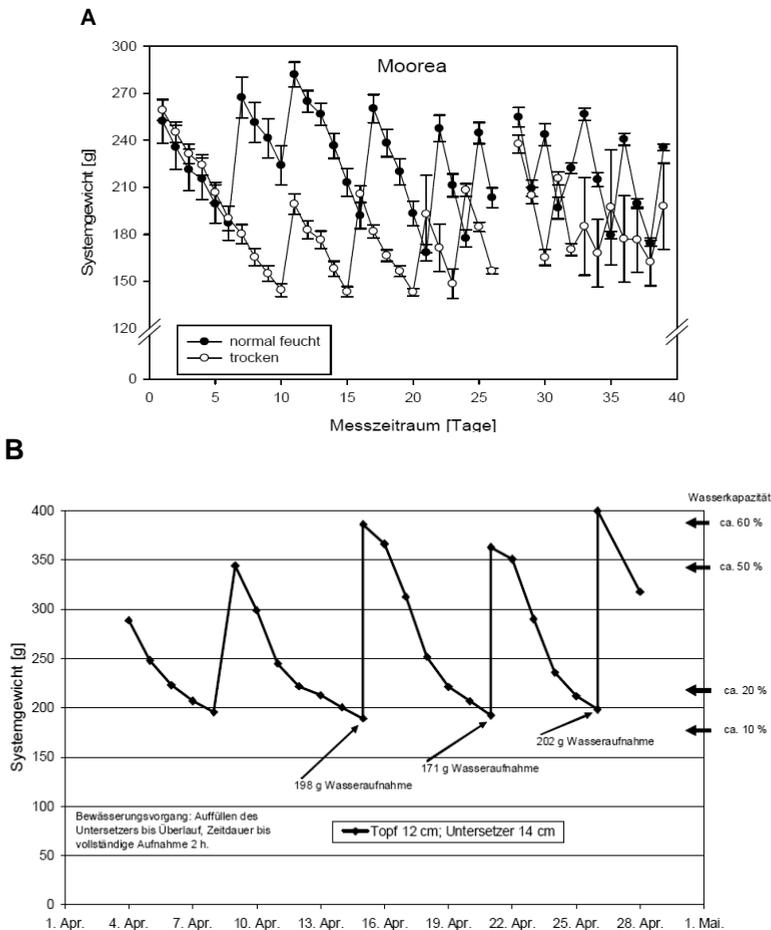


Abb. 1 Wasserangebot in den Versuchspartzellen während der Pflanzenanzucht. Verlauf des Topfwassergehaltes bei Bewässerung (A) ohne Untersetzer am Beispiel Impatiens und (B) unter Verwendung von 14 cm-Untersetzern am Beispiel Petunien (nur Trockenvariante).

○ **Vegetationsversuche unter Gewächshausbedingungen (Kleinparzellenanlage):**

Die Vegetationsversuche unter Gewächshausbedingungen dienten dazu, den Einfluss des Wasserangebotes bzw. der Trockenstressintensität auf Wachstumsleistungen der Genotypen zu prüfen. Daneben wurden Pflanzen herangezogen, an denen der Einfluss der Anzuchtbedingungen auf die Trockenstresstoleranz untersucht werden konnte. Zur Charakterisierung der Wachstumsleistung wurden der Pflanzendurchmesser und die Frischmasse der Pflanzen ermittelt. Zusätzlich wurden Blühbeginn und Wurzelwachstum (Wurzelentwicklung und -qualität) erfasst. Von den ermittelten Parametern erwies sich die Frischmasse als besonders aussagekräftig. Abbildung 2 zeigt beispielhaft die Frischmassenreduktion durch Trockenstress bei verschiedenen Impatiens Genotypen. Unter den gewählten Versuchsbedingungen betrug die Frischmassenreduktion durchschnittlich 40 % mit zum Teil deutlichen Unterschieden zwischen den getesteten Genotypen. Diese Massenreduktion wird daher als ein praxistauglicher Parameter zur Charakterisierung der Trockenstresstoleranz eingestuft.

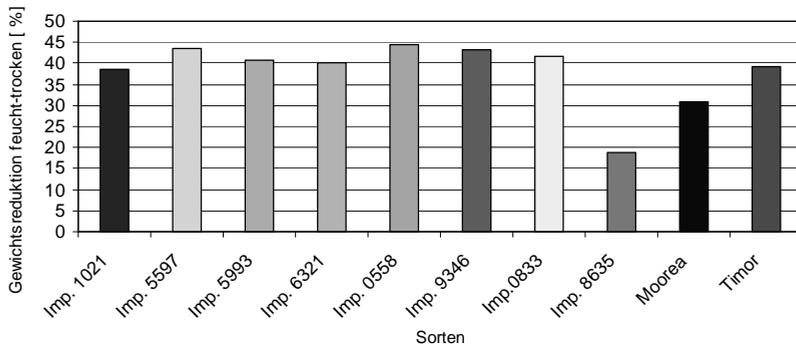


Abb. 2 Relative Reduzierung der Frischmassenbildung verschiedener Impatiens-Genotypen nach Anzucht unter verschiedenen Wasserangeboten im Vegetationsversuch

○ **Dehydrierungsversuche zur Identifizierung von Trockenstresstoleranz im Kurzzeitexperiment:**

Zierpflanzen verlieren beim Auftreten von Trockenstress ihren Zierwert. Es ist daher nahe liegend, ihr Welkeverhalten in Dehydrierungsversuchen zu prüfen und als Indikator der Trockenstresstoleranz zu definieren.

Aus den Pflanzenbeständen der Kleinparzellenanlage wurden zu zwei Terminen Testpflanzen für Dehydrierungsexperimente entnommen und in Klimakammern einer Austrocknung unterworfen. Neben dem Welkeverlauf wurden das Systemgewicht und die Saugspannung erfasst. Zur Charakterisierung der Trockenstresstoleranz wurde die Welkeintensität als Funktion der Saugspannung dargestellt.

Sowohl bei den untersuchten Petunien- als auch den Impatiens-Sorten waren deutliche Unterschiede hinsichtlich des Welkebeginns und Welkeverlaufes festzustellen (Abbildung 3A). Daneben war zu erkennen, dass das Wasserangebot in der Anzuchtphase auf Grund von Anpassungsphänomenen erheblichen Einfluss auf den Welkeverlauf nimmt (Abbildung 3B). Weiterhin wurde die Welkeanfälligkeit in hohem Maße durch die Blattfläche der Prüfsorten bestimmt.

Um das Verhalten der Genotypen in den verschiedenen Dehydrierungsexperimenten miteinander vergleichen zu können, wurde eine semiquantitative Bewertung der Trockenstresstoleranz vorgenommen. Die Pflanzen wurden dabei in drei Klassen bezüglich ihrer Trockenstresstoleranz eingeteilt (sehr tolerant, durchschnittlich tolerant und wenig tolerant). Die Klassifizierung erfolgte durch das Ermitteln des Systemgewichtes bei Erreichen der Boniturnote 9 (Tabelle 2).

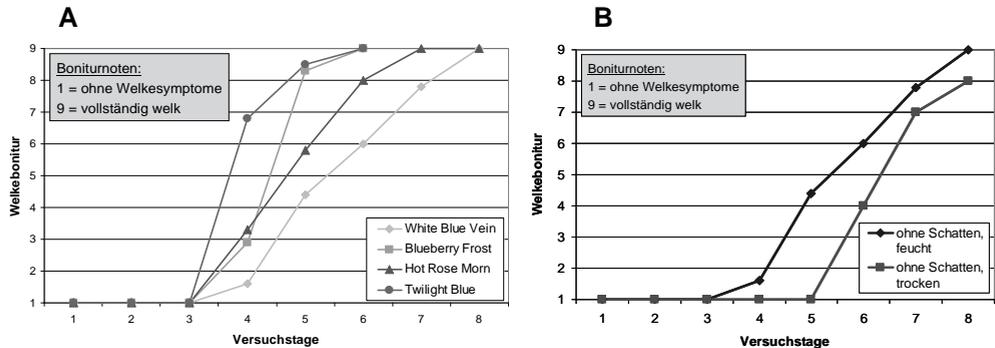


Abb. 3 Welkeverlauf verschiedener Petunien-Sorten im Dehydrierungsexperiment. A, Vergleich von 4 Petunien-sorten aus der gut gewässerten Vorkultivierungsvariante; B, Vergleich einer Petunien-sorten aus den beiden unterschiedlichen Vorkultivierungsvarianten

Tab. 2 Semiquantitative Bewertung der Trockenstresstoleranz verschiedener Impatiens-Genotypen anhand des Welkeverhaltens im Dehydrierungsexperiment (1= sehr tolerant, 3=wenig tolerant). Jedes Dehydrierungsexperiment wurde dreimal durchgeführt.

Sorte	Ranking 1/2009 feucht*	Ranking 2/2009 feucht	Ranking 3/2009 feucht	Ranking 1/2009 trocken	Ranking 2/2009 trocken	Ranking 3/2009 trocken	Mittelwert	Standard-Abweichung
Imp. 9346	1	1	1	1	1	1	1	0
Imp. 5993	2	1	1	1	1	2	1,33	0,52
Timor	2	1	2	2	1	2	1,67	0,52
Imp. 8635	1	2	2	1	1	3	1,67	0,82
Imp. 5597	1	1	2	1	2	3	1,67	0,82
Imp. 1021	2	2	2	2	2	2	2	0
Imp. 6321	3	2	2	3	3	2	2,5	0,55
Moorea	2	3	3	2	2	3	2,5	0,55
Imp. 0588	3	3	3	3	3	3	3	0
Imp. 0833	3	3	3	3	3	3	3	0

*feuchte bzw. trockene Anzucht der Genotypen im Vegetationsversuch

Inzwischen ist das Verfahren soweit standardisiert, dass es für Anwendungen in der Praxis geeignet erscheint. Wegen der hohen Trennschärfe zwischen den Genotypen und der einfachen Standardisierung des Testes hat sich das Welkeverhalten der Pflanzen im Dehydrierungsexperiment somit zum Schlüsselkriterium für das Screeningkonzept entwickelt.

o **Vegetationsversuche im Freiland:**

Zur Überprüfung, inwieweit die Anzuchtbedingungen die Trockenstresstoleranz beeinflussen und zum Studium der Wechselwirkungen zwischen Trockenstress und Strahlungstress wurden in Geisenheim Freilandtestungen mit den aus der Kleinparzellenanlage stammenden Pflanzen durchgeführt. Zunächst standen im Freiland methodische Aspekte im Vordergrund des Interesses. Zur Differenzierung des Wasserangebotes wurde den trockenen Varianten bei Unterschreitung eines definierten Systemgewichtes nur etwa 50% der Wassermenge zugeführt, die als optimale Versorgung notwendig waren. Diese Versuchsbedingungen führten bei einigen Impatiens-Sorten zum Totalausfall. Besonders drastisch waren diese Effekte bei Pflanzen aus einer Anzucht mit hohem Wasserangebot und niedrigem Schattiersollwert

Wesentlich besser überstanden wurden die Stressbedingungen von den im Test befindlichen Petunienarten. Robustestes Produkt in diesem Test war die Begonien-Sorte 'Richard Galle', die den 8-wöchigen Prüfzeitraum mit nur 4 Bewässerungsvorgängen überstanden hat.

Insgesamt gestaltete sich dieser Teilaspekt der Trockenstresscharakterisierung als der schwierigste Projektteil, da es einerseits nicht zufriedenstellend gelungen war, das Wasserangebot unter Freilandbedingungen zu standardisieren und zu automatisieren und Strahlungs- und Trockenstresseffekte kulturabhängig zu differenzieren. Eventuell muss versucht werden, das Freilandverhalten unter Trockenstress ebenfalls im Rahmen von kurzzeitigen Dehydrierungsversuchen zu erfassen. Die Differenzierung zwischen Strahlungstoleranz und Trockenstresstoleranz erscheint dagegen so komplex, dass eine substanzielle Bearbeitung nur im Rahmen eines Folgeprojektes möglich erscheint.

○ Ringversuch bei den Züchtern:

Nach der Erarbeitung des Drei-Stufen-Konzept als taugliches Verfahren zur Identifizierung trockenstresstoleranter Genotypen wurde im nächsten Schritt eine stark vereinfachte Version auf seine Eignung für Züchtungsbetriebe geprüft. Grundidee dieses vereinfachten Screeningverfahrens sind sich wiederholende Austrocknungs- und Wiederbefeuchtungsphasen (De- und Rehydrierungsprozesse) unter Gewächshausbedingungen. Mit diesem Konzept wurde auch das Ziel verfolgt, Trockenstresssituationen unter Konsumentenbedingungen (sporadische Bewässerungen im Wechsel mit sich wiederholenden Trockenstressphasen) zu simulieren. Zur Charakterisierung der Trockenstresstoleranz wurde die Bewässerungshäufigkeit der einzelnen Genotypen während des 6-wöchigen Prüfzeitraumes erfasst. Am Versuchsende wurden zusätzlich aufgetretene Pflanzenschäden (Nekrosen 1-9), die Frischmassenreduktion durch Trockenstress, sowie (bei Petunien) die Anzahl der Blüten aufgenommen. Genotypen mit einer geringen Frischmassenreduktion, geringerem Blütenverlust und/oder wenigen Pflanzenschäden werden bei der Bewertung als trockenstress-tolerant eingestuft. Zur Auswertung wurde an den beteiligten Standorten für jeden Parameter ein spezifisches Ranking ermittelt. (Tabelle 3).

Tab. 3 Ergebnisse des Ringversuches (vereinfachter Dehydrierungstest). 6 Petunien- und 5 Impatiens-Sorten wurden an 4 verschiedenen Standorten über 6 Wochen periodischem Trockenstress ausgesetzt. Die Auswertung erfolgte im Vergleich zu einer gut bewässerten Variante und mündete in einem Ranking der Sorten hinsichtlich des Ausmaßes der Trockenstresstoleranz. Standort 1 = Geisenheim; Standort 2 = Hann. Münden; Standort 3 = Gensingen; Standort 4 = Stuttgart, n.b. = nicht bestimmt

Merkmal	Standort	Petunien						Impatiens				
		Veranda White	Dark Violet	Veranda Salmon	Lilac Dark Vein	Hot Rose Morn	Odyssey	Timor	i-0588-3	K06-6321	Cerise Frost	Salmon Pink
Pflanzenschäden	1	3	2	6	1	5	4	1	2	5	3	4
	2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1	2	5	3	4
	3	2	3	1	5	3	6	3	1	2	5	6
	4	2	1	3	5	4	6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	Ø	2,3	2,0	3,3	3,7	4,0	5,3	1,7	1,7	4,0	3,7	4,7
Gewichtsreduktion	1	3	5	2	4	1	6	4	1	2	3	5
	2	4	3	2	1	6	5	3	1	4	2	5
	3	6	2	1	4	3	5	2	5	1	4	3
	4	4	1	6	5	2	3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	Ø	4,3	2,8	2,8	3,5	3,0	4,8	3,0	2,3	2,3	3,0	4,3
Bewässerungshäufigkeit	1	1	4	3	5	6	2	3	5	4	1	2
	2	1	2	4	5	4	6	3	5	4	1	2
	3	1	4	6	2	4	5	4	5	1	3	2
	4	6	5	3	1	3	4	2	3	1	4	5
	Ø	2,3	3,8	4,0	3,3	4,3	4,3	3,0	4,5	2,5	2,3	2,8
Blütenanzahl	1	2	4	1	3	5	6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	2	1	4	3	2	6	5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	3	4	2	1	3	6	5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	4	2	3	6	4	1	5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	Ø	2,3	3,3	2,8	3,0	4,5	5,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Durchschnitt		2,8	2,9	3,2	3,4	3,9	4,9	2,6	2,8	2,9	3,0	3,9

Die Ergebnisse bei Impatiens deuten darauf hin, dass sich die untersuchten Merkmale zwischen den Standorten stärker unterscheiden als zwischen den Genotypen. Dies lässt darauf schließen, dass die verabredeten Protokolle zur Pflanzenbehandlung und insbesondere zur Trockenstressapplikation nicht bei allen Partnern konsequent angewendet werden konnten und noch einen zu großen Raum für individuelle Unterschiede an den verschiedenen Standorten ließen. Neben der Wasser- und Nährstoffversorgung haben auch die Klimabedingungen an den einzelnen Standorten variiert und somit die Heterogenität der Bewertungen gefördert haben. Klimaaufzeichnungen zur Überprüfung dieser Hypothese liegen nur von einzelnen Standorten vor. Bei den Petunien wurden zusätzlich zu den Merkmalen Frischmassenreduktion, Gießhäufigkeit und Pflanzenschäden auch die Blütenzahl und ihre Reduzierung durch Trockenstressapplikation erfasst. Ähnlich wie bei Impatiens unterschieden sich auch die im Test befindlichen Petunien-Genotypen in ihrem Ranking stark voneinander (Tabelle 3). Allerdings fallen bei der Bewertung die Sorte 'Veranda White' durch viele niedrige Bewertungen (hohe Trockenstresstoleranz) und die Sorte 'Odyssey' durch viele hohe Bewertungen (niedrige Trockenstresstoleranz) auf. Zwischen den Standorten sind allerdings auch bei diesem Merkmal erneut große Unterschiede festzustellen.

Insgesamt hat sich auch bei den Petunien gezeigt, dass das Pflanzenwachstum und die gewählten Toleranzparameter Frischmassenreduktion, Blütenbildung und Schadintensität nach Trockenstressapplikation stärker durch die Bedingungen am Versuchsstandort als durch den Genotyp definiert werden. Dieser Sachverhalt belegt erneut den großen Einfluss der Standortbedingungen auf die Merkmalsausprägung von Zierpflanzen und die Notwendigkeit von Produkttestungen an verschiedenen Standorten. Gleichzeitig kann daraus geschlossen werden, dass Screeningprozesse mit einem Anspruch auf Reproduzierbarkeit zu einer deutlich exakteren Definition und Einhaltung der Kultur- und Versuchsbedingungen zwingen als das im Rahmen dieses Projektes realisiert wurde. Die gemessenen Unterschiede in der Nährstoffversorgung der Pflanzen und im Salzgehalt der Substrate beeinflussen bekanntermaßen die Stressintensität und damit auch die Testbedingungen. Ähnliches gilt auch für die bei diesem Projekt eingesetzten Boniturparameter. Beleg hierfür sind die sehr unterschiedlichen Bewertungen der Pflanzenschäden an den einzelnen Standorten und zwischen den Genotypen.

Neben den aufgeführten Ursachen kann man spekulieren, ob die genetischen Kontraste der geprüften Sorten zu gering waren, um sie mit Hilfe eines einfachen Praxistestes aufzudecken. Weiterhin ist denkbar, dass die Klimabedingungen und insbesondere die Einstrahlung am Ende der Differenzbehandlung die Intensität der Pflanzenschäden nach Trockenstressapplikation beeinflusst haben.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP) für die Koordination des Gesamtprojektes. Das Projekt wurde gefördert aus Mitteln.

Zugang zu neuen FuE-Konzepten durch innovative Verfahren der Pflanzenphänotypisierung

Access to novel R&D concepts through innovative plant phenotyping approaches

Altmann, Thomas

Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Corrensstraße 3, 06466 Gatersleben

DOI: 10.5073/jka.2011.433.008

Zusammenfassung

Die Entwicklung und Anwendung automatisierter Verfahren der nicht- oder minimal-invasiven Erfassung von Eigenschaften und Merkmalen von Pflanzen eröffnet neue Möglichkeiten der Identifizierung genetischer Faktoren, die pflanzliche Leistungen und Charakteristika bestimmen, der Untersuchung von Umwelteinflüssen auf die Merkmalsausprägung, der Selektion von Individuen oder Linien mit vorteilhaften Eigenschaften aus großen Populationen, der Optimierung von Pflanzenproduktionsverfahren und des

Erkennens neuer Nutzungsmöglichkeiten für Pflanzen. Dieses wird durch die Entwicklung und Nutzung präziser und von der menschlichen Wahrnehmung unbeeinflusste und (idealerweise) hochdurchsatzfähige Messverfahren erreicht, mit deren Hilfe Eigenschaften genauer und für wesentlich größere Individuenzahlen als mit bisherigen Methoden bestimmt werden können, bisher nicht zugängliche Eigenschaften bestimmt werden können und durch wiederholte Messungen in zeitlicher Abfolge dynamische Prozesse beobachtet und quantifiziert werden können. Dazu sind (neuartige) Sensor- und Detektionsverfahren zu entwickeln und zu implementieren, Automatisierungsverfahren anzupassen und einzurichten, entsprechende Anlagen zu entwickeln und zu installieren, in denen neben den Pflanzeigenschaften simultan Umweltbedingungen erfasst und/oder simuliert werden, geeignete experimentelle Verfahren zu entwickeln und wirkungsvolle Datenanalysewerkzeuge zu etablieren und einzurichten.

Stichwörter: Phänomik, Sensorik, Fernerkundung, Automatisierung, Umweltbeobachtung/-simulation,

Abstract

The development and use of automated procedures of non- or minimal invasive monitoring of plant traits and features opens new opportunities for the identification of genetic factors determining plant characteristics and performance parameters, for the investigation of environmental effects on trait expression, for the selection of individuals or lines with preferred features from large populations, for the optimization of plant production systems, and for the recognition of novel uses of plants. This is achieved through development and application of precise and unbiased measurement procedures (not influenced by human perception), which (ideally) are amenable to high-throughput approaches. They enable more accurate and much larger scale investigations or screenings than hitherto possible, they allow the detection of features that previously could not be assessed, and they offer access to monitoring and quantification of dynamic processes through repeated measurements over time. To this end, (novel) sensor and detection systems have to be developed and implemented, automation procedures have to be adapted and established, corresponding facilities have to be constructed and installed, which support monitoring and/or simulation of certain environmental parameters (in addition to the measurement of plant features) and effective data analysis tools have to be developed and implemented.

Keywords: Phenomics, sensorics, remote sensing, automation, environment monitoring/-simulation

Einleitung

Pflanzenphänotypisierung bezeichnet die Erfassung der Eigenschaften und Merkmale von Pflanzen (pflanzlicher Phänotypen), die sich im Verlaufe der Individualentwicklung durch die Ausprägung der Erbinformation und die Einwirkung von Umwelteinflüssen herausbilden. Die Etablierung und Verfügbarkeit technischer Infrastrukturen und damit verbundener innovative Verfahren zur Pflanzenphänotypisierung sind eine wichtige Voraussetzung für zukünftigen Erkenntnisgewinn in der gesamten Bandbreite der grundlagen- und anwendungsorientierten Pflanzenforschung, für die Erschließung neuer pflanzlicher Ressourcen und für die effiziente Anwendung und Nutzung neuer Informationen und Produktionsmittel. In der Grundlagenforschung schließt dies die umfassende Aufklärung von biologischen Prozessen und Phänomenen sowie von Ursachen und Effekten biologischer Vielfalt ein. Im Bereich der anwendungsbezogenen Forschung werden mit der Phänotypisierung innovative Möglichkeiten und für die Erschließung und Nutzung neuer pflanzlicher Ressourcen und für die Entwicklung und Validierung pflanzenbiotechnologischer Ansätze eröffnet. In der praktischen Pflanzenzüchtung und der industriellen Pflanzenbiotechnologie sowie in der nachgelagerten Pflanzenproduktion können wesentliche Effizienzsteigerungen erzielt werden. Die Pflanzenphänotypisierung stellt somit eine wichtige zukunftsorientierte Technologieplattform für die pflanzenbasierte BioÖkonomie dar. Eine möglichst präzise und effektive Bestimmung der Architektur, der physiologischen Leistungen, der stofflichen Zusammensetzung und der Reaktionen von Pflanzen auf Umwelteinflüsse ist eine entscheidende Voraussetzung für

- Identifizierung und Charakterisierung genetischer Faktoren, welche pflanzliche Merkmale und Leistungen sowie das Reaktionsvermögen von Pflanzen auf äußere Einflüsse bestimmen,
- Erfassung und Untersuchung der Effekte von Umweltfaktoren auf die Entwicklung, das Wachstum und die Leistungsfähigkeit von Pflanzen,
- Identifizierung von Pflanzenindividuen oder -linien, die besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen,
- Entwicklung optimaler Produktionsbedingungen für Nutzpflanzen und
- Erkennen neuer Nutzungsmöglichkeiten für Pflanzen.

Auf Grund der enormen Fortschritte in der Genomanalyse und der Anwendung von neuesten DNA-Sequenzierungs- und Typisierungsverfahren sind sehr umfangreiche Genotypinformationen von vielfältigen pflanzlichen Modellorganismen (z.B. Atwell et al., 2010) und wichtigen Kulturpflanzen (z.B. Huang et al., 2010; Lai et al., 2010) verfügbar geworden und es besteht Zugang zu einer weiteren massiven Zunahme der Kenntnisse zu Genomsequenz- und Kopiezahlvariation (z.B. Fu et al., 2010; Elshire et al., 2011; Springer et al., 2009). Ferner bieten neben der Hochdurchsatznukleinsäureanalytik molekularbiologische und biochemische Analyseverfahren als weitere `Omics'-Technologien Zugang zu tiefen Informationen im Bereich der molekularen Ausprägung der Erbinformation auf der Ebene von RNA-, Protein- und Metabolitprofilen (Transkriptom, Proteom, Metabolom) und erlauben Verfahren zur Detektion von Wechselwirkungen zwischen molekularen Komponenten detaillierte Einblicke in regulative und metabolische Netzwerke. Damit bestehen hoch effektive Möglichkeiten der Aufklärung molekularer Prozesse und der darin involvierten Faktoren, und durch Integration mit Genotypdaten Zugänge zur Identifizierung von Genen und deren allelischer Variation, die ursächlich sind für die Diversität bzgl. bestimmter pflanzlicher Eigenschaften (Langridge und Fleury, 2011) wie der Resistenz gegenüber Pathogenen, Toleranz gegenüber abiotischen Stressfaktoren, Entwicklungsprozessen wie der Blühinduktion oder Qualitätsparametern.

Um allerdings das Potenzial der sich durch Koppelungs- und Assoziationskartierung unter Nutzung der immer umfangreicher verfügbaren Genotypdaten eröffnenden Ansätze zur Identifizierung der für komplexe morphologische und/oder physiologische Eigenschaften sowie komplexer Wechselwirkungen mit der Umwelt verantwortlichen Gene (und deren Variation) verfolgen zu können, sind neue Verfahren der präzisen Erfassung von Eigenschaften im Hochdurchsatz erforderlich (Heard et al., 2010; Kolkusaoglu und Thurow, 2010). Dabei ist es nicht nur nötig einzelne Parameter in hoher Präzision zu einem bestimmten Zeitpunkt (z.B. einem bestimmten Entwicklungs- oder Reifestadium) für eine große Zahl von Individuen bestimmen zu können, sondern es bedarf der Messung vielfältiger relevanter Parameter, um die Ursachen für die Ausbildung komplexer biologischer Phänomene aufklären zu können (Houle et al., 2010). Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich die Eigenschaften von Individuen (ihr Phänom als Gesamtheit aller Eigenschaften) durch komplexe Wechselwirkungen zwischen ihren genetischen Faktoren und den sie beeinflussenden Umweltfaktoren im Verlaufe ihrer Entwicklung ergeben und Umweltfaktoren dabei Einfluss auf die Ausprägung von Eigenschaften im genetisch bestimmten Rahmen nehmen, die Individuen jedoch ihrerseits ihre Umwelt modifizieren und dass entscheidende Rückkopplungen zwischen diesen Interaktionen bestehen (Konzept der Genotyp-Umwelt-Phänotyp-Karten, Houle et al., 2010). Daher sind mehrfache Messungen vielfältiger Parameter während der Individualentwicklung erforderlich, um die (ggf. individuell unterschiedliche) Dynamik der Prozesse und der Wechselwirkungen berücksichtigen zu können. Neben der Anforderung Messungen vielfältiger Parameter in hoher Präzision und hohem Durchsatz durchführen zu können, ist es daher darüber hinaus nötig nicht- oder minimal-invasive Methoden zum Einsatz zu bringen, sodass die wiederholte Untersuchung der selben Individuen möglich ist. Phänotypisierung (Phenomik) bezeichnet somit die (Entwicklung und) Anwendung von Verfahren zur Erfassung hoch-dimensionaler Merkmalsdaten gesamter Organismen auf unterschiedlichen räumlichen und zeitlich Skalen (Furbank, 2009). Diese Verfahren finden wie oben erwähnt Anwendung in einer großen Bandbreite von Nutzungen und sie bedürfen damit der Implementierung für Analysen von der Zell- über die Organ-, Gesamtpflanzen- bis zur Bestands-Ebene und für die Kultur von Pflanzen unter kontrollierten Anzuchtbedingungen, in denen

bestimmte Umweltsituationen hoch reproduzierbar dargestellt werden können und gezielt entscheidende Parameter variiert werden können, und andererseits für die Pflanzenkultur unter natürlichen (variierenden) Bedingungen (im Feld). Auf Grund der entscheidenden Bedeutung der Umweltfaktoren, die auf die beobachteten/analysierten Pflanzen einwirken, ist es essentiell neben den Pflanzenmerkmalen auch die lokalen (pflanzennahen) Umweltparameter simultan zu messen und in die Modellierung der beobachteten Prozesse einzubeziehen. Entsprechend der dargestellten Anforderungen stellen sich für die Entwicklung und Etablierung der Pflanzenphänotypisierung Herausforderungen in vielfältigen Bereichen:

- Entwicklung, Anpassung und Implementierung von Sensor- und Detektionstechniken für vielfältigste Eigenschaften, die idealerweise nicht-invasiv sind und gleichzeitig für den Hochdurchsatz geeignet sind,
- Entwicklung, Optimierung und Nutzung von Automatisierungsverfahren mit deren Hilfe hohe Zahlen parallel oder sequenziell analysierter Individuen und wiederholte Untersuchungen derselben Individuen ermöglicht werden können,
- Installation der Sensoren und Automatisierungen in unterschiedlichsten Anlagen/Plattformen gekoppelt mit Umweltmonitoring (z.B. im Feld) und/oder Umweltsimulation (z.B. in Expositions-kammern),
- Etablierung von spezifischen experimentellen Untersuchungsverfahren und Definition entscheidender (und möglichst effektiv bestimmbarer) Messparameter, um genetische Variation bzgl. wichtiger Merkmale und/oder deren Ausprägung unter bestimmten Umweltbedingungen effizient zu erfassen,
- Entwicklung, Optimierung und Einrichtung von Datenanalyseverfahren, die es ermöglichen aus den Messdaten die für die jeweilige Fragestellung relevanten Informationen zu extrahieren und die geeignet sind mit hochdimensionalen Datensätzen (von begrenzten Individuenzahlen) umzugehen,
- Integration der phänomischen Daten mit genomischen (Genotyp) und molekularen / biochemischen ('Omics'-) Daten und Einrichtung und Nutzung von Modellierungsmethoden, die es erlauben die hierarchischen, zeitlichen und räumlichen Abläufe und Wechselwirkungen aufzuklären, die zur Ausbildung bestimmter Eigenschaften führen.

Gemäß der Anforderungen nicht-destruktive Methoden einzusetzen, mit denen wiederholte Messungen der selben Individuen oder Bestände in hohem Durchsatz erfolgen können, bieten sich besonders optische Datenaufnahmeverfahren für die Phänotypisierung oberirdischer Pflanzenbereiche an. Diese reichen von automatisierten elektronischen Farbbildaufnahmesystemen des gesamten sichtbaren Spektralbereichs (z.B. Granier et al., 2006; Walter et al., 2007; Reuzeau et al., 2006; Meyer et al., 2010; www.lemnatec.de) zur Bestimmung von Blattflächen, projizierten Flächen des Sprosses oder Pflanzengrößen (Wachstumsbeobachtung) sowie Pigment-/Farbverteilungen oder von Fluoreszenzsignalen (z.B. Jansen et al., 2009) zur Detektion von Chlorophyll und anderen Fluorophoren, über Aufnahmen in nahen (z.B. Seelig et al., 2008, 2009) oder mittleren (z.B. Jones et al., 2009) Infrarotbereichen zur Erfassung von Wassergehalten bzw. Oberflächentemperaturen, bis zu Multi- und Hyperspektralanalysen (z.B. Rascher et al., 2010; Winterhalter et al., 2011a, 2011b), mit deren Hilfe Indexwerte für diverse Charakteristika (z.B. Wasser- oder Nährstoffversorgungsstatus, photosynthetische Aktivität) ermittelt werden können. Die breite Spanne der Anwendungsbereiche optischer Verfahren reicht dabei von der mikroskopischen Ebene (z.B. Ihlow et al., 2008) bis zur Fernerkundung unter Nutzung von Beobachtungstürmen, Flugzeugen oder Satelliten (z.B. Zarco-Tejada et al., 2009; Pieruschka et al., 2010; Gomez et al., 2011).

Für die Wurzelbeobachtung sind optische Verfahren eingeschränkter für die Erfassung von Strukturen an Oberflächen (z.B. in Wurzelkästen, Johnson et al., 2001) oder in künstlichen (durchsichtigen) Substraten bzw. Anzuchtverfahren anwendbar (z.B. Nagel et al. 2009; Iyer-Pascuzzi et al., 2010; Zhu et al., 2011). Zu 3D Darstellung von Wurzeln im Boden gewinnen daher durchdringende Methoden wie Röntgen-CT (z.B. Tracy et al., 2010) oder Magnetresonanztomographie (MRI, z.B. Jahnke et al., 2009) große Bedeutung, die gegenwärtig allerdings nur für einen begrenzten Durchsatz geeignet sind. MRI lässt sich mit Positronenemissionstomographie (PET) kombinieren, die zur Lokalisierung ¹¹C-markierter gefütterter Substanzen und damit für wichtige physiologische Untersuchungen genutzt werden kann (Jahnke et al.,

2009). Jüngste Entwicklungen im Bereich der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und MRI erlauben über die nicht-invasive 3D-Darstellung von Strukturen und Geweben bestimmter Pflanzenteile oder Organe (z.B. Samen) hinaus die (nicht-destruktive) quantitative Erfassung von bestimmten Substanzen oder Substanz-gruppen in hohem Durchsatz (z.B. Lipide, Proteine, Kohlenhydrate oder individuelle Metabolite wie Saccharose, Alanin) oder, in niedrigem Durchsatz, deren räumliche Verteilung (Borisjuk et al., 2011). Ferner können mittels MRI dynamische Veränderungen der räumlichen Verteilung individueller ^{13}C markierter (gefütterter) Substanzen beobachtet werden (Melkus et al., 2011; Rolletschek et al., 2011) und damit Substanz-spezifische Transport- und Akkumulations- bzw. Abbau-Prozesse *in vivo* verfolgt werden.

Die höchst umfangreichen, komplexen und multidimensionalen Datensätzen, die mit Hilfe der o.g. Verfahren gewonnen werden, bedürfen nicht nur individuell angepasster und optimierter Datenanalyseverfahren (z.B. Biskup et al., 2009; Nagel et al., 2009; Hartmann et al., 2011) sondern darüber hinaus sind Datenbank-, Management-, Integrations- und Visualisierungssysteme für die erhobenen Pflanzen-bezogenen Daten (z.B. Junker et al., 2006; Klukak und Schreiber, 2010; Mehlhorn und Schreiber, 2011; Rohn et al., 2011) und die Experiment-Metadaten (z.B. Hannemann et al., 2009) erforderlich, die es erlauben relevante Informationen abzuleiten und entscheidende Beziehungen zwischen verschiedenen Parametern und Merkmalen zu detektieren.

Literatur

- Atwell, S., Huang, Y. S., Vilhjálmsson, B. J., Willems, G., Horton, M., Li, Y., Meng, D., Platt, A., Tarone, A. M., Hu, T. T., Jiang, R., Muliya, N. W., Zhang, X., Amer, M. A., Ivan Baxter, I., Brachi, B., Chory, J., Dean, C., Debieu, M., de Meaux, J., Ecker, J. R., Faure, N., Kniskern, J.M., Jones, J.D.G., Michael, T., Nemri, A., Roux, F., Salt, D. E., Tang, C., Todesco, M., Traw, M.B., Weigel, D., Marjoram, P., Borevitz, J. O., Bergelson, J. und M. Nordborg, 2010: Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* **465**, 627-631.
- Biskup, B., Scharr, H., Fischbach, A., Wiese-Klinkenberg, A., Schurr, U. und A. Walter, 2009: Diel growth cycle of isolated leaf discs analyzed with a novel, high-throughput three-dimensional imaging method is identical to that of intact leaves. *Plant Physiol.* **149**, 1452-1461.
- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Fuchs, J., Melkus, G. und T. Neuberger, 2011: Low and high field magnetic resonance for *in vivo* analysis of seeds. *Materials* **4**, 1426-1439.
- Elshire, R. J., Glaubit, J. C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E. S. und S. E. Mitchell, 2011: A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* **6**, e19379.
- Fu, Y., Springer, N. M., Gerhardt, D. J., Ying, K., Yeh, C.-T., Wu, W., Swanson-Wagner, M., Millard, T., Freeberg, L., Aoyama, N., Kitzman, J., Burgess, D., Richmond, T., Albert, T. J., Barbazuk, W. B., Jeddeloh, Huang, X., Wei, X., Sang, T., Zhao, Q., Feng, Q., Zhao, Y., Li, C., Zhu, C., Lu, T., Zhang, Z., Li, M., Fan, D., Guo, Y., Wang, A., Wang, L., Deng, L., Li, W., Lu, Y., Weng, Q., Liu, K., Huang, T., Zhou, T., Jing, Y., Li, W., Lin, Z., Buckler, E. S., Qian, Q., Zhang, Q.-F., Li, J. und B. Han 2010: Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nat. Genet.* **42**, 961-967.
- Furbank, R. T., 2009: Plant phenomics: from gene to form and function. *Funct. Plant Biol.* **36**, V-VI.
- Gomez, J. A., Zarco-Tejada, P. J., Garcia-Morillo, J., Gama, J. und M. A. Soriano, 2011: Determining biophysical parameters for olive trees using a CASI-airborne and Quickbird-satellite imagery. *Agron. J.* **103**, 644-654.
- Johnson, M. G., Tingey, D. T., Phillips, D. L. und M.J., Storm, 2001: Advancing fine root research with minirhizotrons. *Environ. Exp. Bot.* **45**, 263-289.
- Granier, C., Aguirrezabal, L., Chenu, K., Cookson, S. J., Dauzat, M., Hamard, P., Thioux, J.-J., Rolland, G., Bouchier-Combaud, S., Lebaudy, A., Muller, B., Simonneau, T. und F. Tardieu, 2006: PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytol.* **169**, 623-635.
- Hannemann, J., Poorter, H., Usadel, B., Bläsing, O. E., Fink, A., Tardieu, F., Atkin, O. K., Pons, T., Stütt, M. und Y. Gibon, 2009: Xeml Lab: a tool that supports the design of experiments at a graphical interface and generates computer-readable metadata files, which capture information about genotypes, growth conditions, environmental perturbations and sampling strategy. *Plant Cell Env.* **32**, 1185-1200.
- Hartmann, A., Czauderna, T., Hoffmann, R., Stein, N. und F. Schreiber, 2011: HTPheno: an image analysis pipeline for high-throughput plant phenotyping. *BMC Bioinformatics* **12**, 148.
- Houle, D., Govindaraju, D. R. und S. Omholt, 2010: Phenomics: the next challenge. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 855-866.
- Ihlow A., Schweizer P und Seiffert U (2008) A high-throughput screening system for barley/powdery mildew interactions based on automated analysis of light micrographs. *BMC Plant Biology* **8**:6.

- Iyer-Pascuzzi, A. S., Symonova, O., Mileyko, Y., Hao, Y. L., Belcher, H., Harer, J., Weitz, J. S. und P. N. Benfey, 2010: Imaging and analysis platform for automatic phenotyping and trait ranking of plant root systems. *Plant Physiol.* **152**, 1148-1157.
- Jahnke, S., Menzel, M. L., van Dusschoten, D., Roeb, G. W., Bühler, J., Minwuyet, S., Blümmler, P., Temperton, V. M., Hombach, T., Streun, M., Beer, S., Khodaverdi, M., Ziemons, K., Coenen, H. H. und U. Schurr, 2009: Combined MRI-PET dissects dynamic changes in plant structures and functions. *Plant J.* **59**, 634-644.
- Jansen, M., Gilmer, F., Biskup, B., Nagel, K.A., Rascher, U., Fischbach, A., Briem, S., Dreissen, G., Tittmann, S., Braun, S., De Jaeger, I., Metzloff, M., Schurr, U., Scharr, H. und A. Walter, 2009: Simultaneous phenotyping of leaf growth and chlorophyll fluorescence via GROWSCREEN FLUORO allows detection of stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* and other rosette plants. *Funct. Plant Biol.* **36**, 902-914.
- Jones, H. G., Serraj, R., Loveys, B. R., Xiong, L. Z., Wheaton, A. und A. H. Price, 2009: Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Funct. Plant Biol.* **36**, 978-989.
- Junker, B.H., Klukas, C. und F. Schreiber (2006): VANTED: A system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks. *BMC Bioinformatics*, **7**,109.
- Klukas, C und F. Schreiber, 2010: Integration of -omics data and networks for biomedical research. *J. Integr. Bioinform.* **7(2)**: **112**,1-6.
- Kolukisaoglu, U. und K. Thurow, 2010 : Future and frontiers of automated screening in plant sciences. *Plant Sci.* **178**, 476-484.
- Lai, J., Li, R., Xu, X., Jin, W., Xu, M., Zhao, H., Xiang, Z., Song, W., Ying, K., Zhang, M., Jiao, Y., Ni, P., Zhang, J., Li, D., Guo, X., Ye, K., Jian, M., Wang, B., Zheng, H., Liang, H., Zhang, X., Wang, S., Chen, S., Li, J., Fu, Y., Springer, N. M., Yang, H., Wang, J., Dai, J., Schnable, P.S. und J. Wang, 2010: Genome-wide patterns of genetic variation among elite maize inbred lines. *Nat. Genet.* **42**, 1027-1030.
- Langridge, P. und D. Fleury, 2011: Making the most of 'omics' for crop breeding. *Trends Biotechnol.*, **29**, 33-40.
- Heard, E., Tishkoff, S., Todd, J. A., Vidal, M., Wagner, G. P., Wang, J., Weigel, D. und R. Young, 2010: Ten years of genetics and genomics: what have we achieved and where are we heading? *Nat. Rev. Genet.* **11**, 723-733.
- Mehlhorn, H. F. und F. Schreiber, 2011: DBE2 - Management of experimental data for the VANTED system. *J Integr Bioinform.* **8(2)** e162.
- Melkus, G., Rolletschek, H., Fuchs, J., Radchuk, V., Grafahrend-Belau, E., Sreenivasulu, N., Rutten, T., Weier, D., Heinzl, N., Schreiber, F., Altmann, T., Jakob, P. und L. Borisjuk, 2011: Dynamic ¹³C/¹H NMR imaging uncovers sugar allocation in the living seed. *Plant Biotechnol. J.*, doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00618.x
- Meyer, R. C., Kusterer, B., Liseč, J., Steinfath, M., Becher, M., Scharr, H., Melchinger, A. E., Selbig, J., Schurr, U., Willmitzer, L. und T. Altmann, 2010: QTL analysis of early stage heterosis for biomass in *Arabidopsis*. *Theor. Appl. Genet.* **120**, 227-237.
- Nagel, K. A., Kastenholz, B., Jahnke, S., van Dusschoten, D., Aach, T., Mühlich, M., Truhn, D., Scharr, H., Terjung, S., Walter, A. und U. Schurr, 2009: Temperature responses of roots: impact on growth, root system architecture and implications for phenotyping. *Funct. Plant Biol.* **36**, 947-959.
- Pieruschka, R., Klimov, D., Kolber, Z. S. und J. A. Berry, 2010: Monitoring of cold and light stress impact on photosynthesis by using the laser induced fluorescence transient (LIFT) approach. *Funct. Plant Biol.* **37**, 395-402.
- Rascher, U., Damm, A., van der Linden, S., Okujeni, A., Pieruschka, R., Schickling, A. und P. Hostert, 2010: Sensing of Photosynthetic Activity of Crops. In: *Precision Crop Protection - the Challenge and Use of Heterogeneity* (eds E.-C.Oerke et al.), Springer.
- Reuzeau, C., Frankard, V., Hatzfeld, Y., Sanz, A., Van Camp, W., Lejeune, P., De Wilde, C., Lievens, K., de Wolf, J., Vranken, E., Peerbolte, R. und W. Broekaert, 2006: Traitmill™: a functional genomics platform for the phenotypic analysis of cereals. *Plant Genet. Res.: Charact. and Utiliz.* **4**, 20-24.
- Rohn, H., Klukas, C. und F. Schreiber, 2011: Creating Views on Integrated Multi-Domain Data. *Bioinformatics* **27**, 1839-1845.
- Rolletschek, H., Melkus, G., Grafahrend-Belau, E., Fuchs, J., Heinzl, N., Schreiber, F., Jakob, P. M. und L. Borisjuk, 2011: Combined non-invasive imaging and modelling approaches reveal metabolic compartmentation in the barley endosperm. *Plant Cell*, doi:10.1105/tpc.111.087015.
- Schnable, J. A., Schnable, P. 2010: Repeat subtraction-mediated sequence capture from a complex genome. *Plant J.* **62**, 898-909.
- Seelig, H. D., Hoehn, A., Stodieck, L. S., Klaus, S. M., Adams, W. W. und W.J. Emery, 2008: The assessment of leaf water content using leaf reflectance ratios in the visible, near- and short-wave-infrared. *Int. J. Remote Sens.* **29**, 3701-3713.

- Seelig, H. D., Hoehn, A., Stodieck, L. S., Klaus, S. M., Adams, W. W. und W.J. Emery, 2009: Plant water parameters and remote sensing r (1300)/R (1450) leaf water index: controlled condition dynamics during the development of water deficit stress. *Irrig. Sci.* **27**, 357-365.
- Springer, N. M., Ying, K., Fu, Y., Ji, T., Yeh, C.-T., Jia, Y., Wu, W., Richmond, T., Kitzman, J., Rosenbaum, H., Iniguez, A. L., Barbazuk, W. B., Jeddeloh, J. A., Nettleton, D. und P. S. Schnable, 2009: Maize inbreds exhibit high levels of copy number variation (CNV) and presence/absence variation (PAV) in genome content. *PLoS Genet.* **5**, e1000734.
- Tracy, S. R., Roberts, J. A., Black, C. R., McNeill, A., Davidson, R. und S. J. Mooney, 2010: The X-factor: visualizing undistrubed root architecture in soils using X-ray computed tomography. *J. Exp. Bot.* **61**, 311-313.
- Walter, A., Scharr, H., Gilmer, F., Zierer, R., Nagel, K. A., Ernst, M., Wiese, A., Virnich, O., Christ, M. M., Uhlig, B., Jünger, S. und U. Schurr, 2007: Dynamics of seedling growth acclimation towards altered light conditions can be quantified via GROWSCREEN: a setup and procedure designed for rapid optical phenotyping of different plant species. *New Phytol.* **174**, 447-455.
- Winterhalter, L., Mistele, B., Jampatong, S. und U. Schmidhalter, 2011a: High throughput sensing of aerial biomass and above ground nitrogen uptake in the vegetative stage of well-watered and drought stressed tropical maize hybrids. *Crop Sci.* **51**, 479-489.
- Winterhalter, L., Mistele, B., Jampatong, S. und U. Schmidhalter, 2011b: High throughput phenotyping of canopy water mass and canopy temperature in well-watered and drought stressed tropical maize hybrids in the vegetative stage. *Europ. J. Agron.* **35**, 22-32.
- Zarco-Tejada, P. J., Berni, J. A. J., Suarez, L., Sepulcre-Canto, G., Morales, F. und J. R. Miller, J. R., 2009: Imaging chlorophyll fluorescence with an airborne narrow-band multispectral camera for vegetation stress detection. *Rem. Sens. Env.* **113**, 1262-1275.
- Zhu, J. M., Ingram, P. A., Benfey, P. N. und T. Elrich, 2011: From lab to field, new approaches to phenotyping root system architecture. *Curr. Op. Plant Biol.* **14**, 310-317.

Resistenzevaluierung mittels eines digitalen Bildanalyzesystems am Beispiel von *Rhododendron*

A Digital Image Analysis System for Resistance Evaluation on *Rhododendron*

Plaschil, Sylvia; Krämer, Reiner

Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Julius Kühn-Institut,

Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg

Tel.: 03946/47-491; E-Mail: sylviaplaschil@jki.bund.de

DOI: 10.5073/jka.2011.433.009

Zusammenfassung

Die Stammgrundfäule (*Cylindrocladium scoparium*) ist eine der wichtigsten pilzlichen Erkrankungen bei der Topfazalee (*Rhododendron simsii*). Für die Resistenzevaluierung sollten geeignete Biotests erarbeitet werden, die es ermöglichen, eine große Anzahl von Genotypen prüfen zu können. Biotests mit Blättern und Triebspitzen wurden entwickelt und ein digitales Bildanalyzesystem zur Auswertung genutzt. Zur Verifizierung der Biotests diente ein Jungpflanzentest unter Gewächshausbedingungen. Alle drei Testmethoden zeigten eine gute Reproduzierbarkeit, jedoch korrelierten die Biotests nur untereinander und nicht mit dem Jungpflanzentest. Sowohl hoch anfällige als auch tolerante Genotypen (R60, R114 und R120) ließen sich mit allen drei Testmethoden nachweisen. Eine Resistenz gegen *C. scoparium* wurde nicht gefunden. Mit der digitalen Bildanalyse steht für das Wirt-Pathogen-System *Rhododendron-Cylindrocladium* in Kombination mit dem Triebspitzentest eine gut adaptierte, zerstörungsfreie Evaluierungsmethode zur Verfügung. Ergebnisse des Triebspitzentests sollten mit einem Test ganzer Pflanzen wie z.B. bewurzelter Stecklinge verifiziert werden.

Stichwörter: *Rhododendron*, *Cylindrocladium*, Resistenz, Biotest

Abstract

Cylindrocladium scoparium is one of the most important fungal pathogens of *Rhododendron simsii*. Successful controlling by breeding for resistance to this pathogen needs sensitive, practicable and reproducible screening methods. A research project aimed at developing effective screening methods for evaluation of plant resources for *Cylindrocladium* resistance in *Rhododendron simsii* will be presented. Bioassays with detached leaves and shoots were established. The responses of the genotypes to *C. scoparium* were estimated by symptom scoring with the digital image analysis system. Tests on young plants in the greenhouse were used to verify the results of bioassays. All three screening methods were reproducible. There was a correlation only between the bioassays but not between the bioassays and the test on young plants. Tolerant genotypes (R60, R114 and R120) could be distinguished from highly susceptible genotypes within all tests. However, resistance against *C. scoparium* did not exist within the screened gene pool. The combination of the bioassay of shoots and the digital image analysis could be used as a well adapted and non-destructive evaluation method of the host-pathogen-system *Rhododendron-Cylindrocladium*. Results of the bioassay of shoots should be verified by testing whole plants like rooted cuttings.

Keywords: *Rhododendron*, *Cylindrocladium*, resistance, bioassay

Einleitung

Die Stammgrundfäule ist eine der wichtigsten pilzlichen Erkrankungen bei der Topfazalee (*Rhododendron simsii*). Der Erreger dieser Krankheit, *Cylindrocladium scoparium*, wurde erstmals von Morgan 1892 beschrieben. Nach der Infektion mit dem Pilz am Stammgrund verfärben sich mit zunehmendem Krankheitsverlauf die Laubblätter braun oder graugrün, welken einzelne Triebe oder die ganze Pflanze, was bis zum Absterben dieser führt (Stegmann 1988). Eine chemische Bekämpfung des Pilzes erweist sich als problematisch (Backhaus & Neubauer 1994). Darüber hinaus sind bisher keine resistenten Sorten bekannt, die man für den gärtnerischen Anbau nutzen könnte. Bei den Resistenzuntersuchungen sollten geeignete Biotests erarbeitet werden, die es ermöglichen, ein breites Sortiment von Topfazaleen und anderer *Rhododendron*-Arten unter standardisierten Bedingungen auf Resistenz prüfen zu können. Für die Biotests wurde die Eignung von Blättern und Triebspitzen geprüft sowie zu deren Auswertung der Einsatz eines digitalen Bildanalyse-systems (Nothnagel & Krämer 2007). Zum Vergleich zu beiden Biotests wurde unter Gewächshausbedingungen ein Jungpflanzen-test durchgeführt.

Material und Methoden

o Pflanzenmaterial:

Für die Resistenzevaluierung standen 86 Genotypen (64 *Rh. simsii*-Sorten, 22 Wildformen oder Sorten von anderen *Rhododendron*-Arten), einschließlich der Standards *Rh. simsii* 'Ganda' (R09) und 'Mevrouw Gerard Kint' (R18) als Gewächshauspflanzen ohne Fungizidbehandlung zur Verfügung. Nach ersten Ergebnissen aus der Evaluierung von 2007 bis 2009 (Plaschil & Krämer 2010) wurden für die Methodenbewertung 20 Genotypen, einschließlich der oben genannten zwei Standards, ausgewählt.

o Kultur von *Cylindrocladium scoparium*:

Einsporlinien eines Isolates von *C. scoparium*, zur Verfügung gestellt von Brielmaier-Liebetanz (JKI, Braunschweig), wurden etabliert und eine hoch virulente Linie wurde für die weitere Nutzung selektiert. Die Kultivierung des Pilzes erfolgte auf Glukose-Kaseinhydrolysat-Agar (Hunter & Barnett 1970; De Keyser *et al.* 2008) bei 22-23 °C in Dunkelheit. Das Optimum der Konidienbildung war nach sieben Tagen Kultivierung erreicht. Die Konidien wurden durch Abschwemmen mit sterilem Wasser geerntet und auf die Endkonzentration von 1×10^6 Konidien pro Milliliter (ml) eingestellt.

o Blatttest:

Von drei Pflanzen je Genotyp wurden jeweils 4 Blätter entnommen (n=12), in Petrischalen auf feuchtem Filterpapier ausgelegt, an der Blattbasis verletzt und mit 3 µl (= 3000 Konidien) Konidien-suspension des Pilzes inokuliert. Die Proben wurden bei 22-23 °C in Dunkelheit inkubiert. Vier, acht und 12 Tage nach

Inokulation erfolgte die Auswertung des Anteils von gesundem und krankem Blattgewebe mit Hilfe eines digitalen Bildanalyse-Systems der Firma LemnaTec, Deutschland. Dazu wurden alle Proben am Tag 0, 4, 8 und 12 digital fotografiert. Der Test wurde 2010 mit drei Wiederholungen (unterschiedliche Zeitpunkte) durchgeführt. Unbehandelte Proben als Kontrolle wurden bei den Einzeltests nicht mitgeführt, da Vortests zeigten, dass sich an ihnen keinerlei Symptome ausprägten (Krämer 2010).

○ **Triebspitzentest:**

Es wurden 10 unverholzte Triebspitzen von ca. 5 cm Länge je Genotyp in Petrischalen (5) auf feuchtem Filterpapier ausgelegt, 2 mm oberhalb der Schnittstelle mit 4 µl (= 4000 Konidien) Konidien suspension des Pilzes inokuliert und bei 22-23 °C ohne Licht inkubiert. Nach 0, 5, 11 und 14 Tagen wurden die Proben digital fotografiert und mit dem digitalen Bildanalyse-System ausgewertet. Der Test erfolgte 2010 mit drei Wiederholungen (unterschiedliche Zeitpunkte). Unbehandelte Proben als Kontrolle wurden bei den Einzeltests nicht mitgeführt, da Vortests zeigten, dass sich an ihnen keinerlei Symptome ausprägten (Krämer 2010).

○ **Jungpflanzenentest:**

Jeweils 13 bis 23 bewurzelte Stecklinge pro Genotyp wurden im Einzeltest am Stammgrund mit 0,5 ml der Konidien suspension des Pilzes in der Konzentration 1×10^6 inokuliert. Ein bis drei unbehandelte Pflanzen pro Genotyp dienten in den Einzeltests als Kontrolle, 6 bis 9 Pflanzen pro Genotyp über alle drei Jungpflanzenentests. Nach 7, 21, 42, 84, 112 und 140 Tagen erfolgte eine Symptombonitur, bei der der prozentuale Anteil von Verbräunungen bzw. graugrünen Verfärbungen am Stängelgrund und an den Blättern sowie Welkeerscheinungen mit einer Boniturnote von 1 bis 5 (Tabelle 1) erfasst wurden. Der Test erfolgte 2010 bis 2011 mit 3 Wiederholungen.

Tab.1 Boniturschlüssel der Symptombonitur im *Rhododendron*-Jungpflanzenentest

Boniturnote	Erkranktes Gewebe (%)	Krankheitssymptome
1	0	symptomlos
2	25	Einzelne Laubblätter, beginnend am Stammgrund, mit leichten Verbräunungen, selten Welke
3	50	Hoher Anteil von Laubblättern mit Verbräunungen, teilweise graugrün und/oder beginnende Welke der Triebe
4	75	Überwiegender Anteil der Laubblätter mit ausgeprägten Verbräunungen oder graugrün und/oder Welke der Triebe
5	100	Pflanze nahezu oder völlig abgestorben, vertrocknet

○ **Digitales Bildanalyse-System:**

Das digitale Bildanalyse-System der Firma LemnaTec besteht aus den Hardwarekomponenten Computer und Aufnahmeeinheit (Scanalyzer). Im Scanalyzer wurde ein digitales Bild der zu untersuchenden Proben bei gleichzeitigem Auf- und Durchlicht unter einheitlichen Bedingungen erzeugt. Mit einer entsprechenden Software ließen sich Farbklassen für gesundes (blau) und krankes (rot) Pflanzengewebe konfigurieren und die jeweiligen Anteile pro Blatt und Triebspitze berechnen. Dabei sollte die Zunahme des Anteils kranken, sich braun oder graugrün färbenden Blatt- bzw. Sprossgewebes über den Untersuchungszeitraum ein Maß für die Anfälligkeit des Genotyps sein. Um genotypabhängige Farbunterschiede im gesunden Blatt- und Sprossgewebe zu minimieren und die Konfiguration der Farbklassen zu optimieren, wurden alle Blätter und Triebspitzen mit einer Überbelichtung aufgenommen.

○ **Statistik:**

Die statistische Analyse der Einzeldaten erfolgte mit der Statistiksoftware *SYSTAT 13* (Chicago, IL: Systat Software, Inc. 2009). Dabei wurden die Daten der drei Testmethoden einer Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen und die drei Einzeltests je Testmethode mit dem Tukey-Test auf mögliche Unterschiede analysiert. Darüber hinaus wurden alle drei Testmethoden einer Korrelationsanalyse (Pearson) unterzogen.

Unterschiede der Anfälligkeit der Sorten wurden für alle drei Testmethoden mit dem Kruskal-Wallis-Test geprüft.

Ergebnisse und Diskussion

o Digitales Bildanalysestestsystem:

18 *Rhododendron*-Genotypen sowie die zwei Standards wurden sowohl im Blatttest als auch im Triebspitzentest auf ihre Resistenz gegen *C. scoparium* untersucht. Mit Hilfe des digitalen Bildanalysestestsystems wurden die prozentualen Anteile von krankem Gewebe ermittelt und als Maß der Anfälligkeit gegen *C. scoparium* gewertet. In beiden Biotests ließen sich Unterschiede der Genotypen bezüglich der Anfälligkeit und der zeitlichen Symptomausprägung ermitteln (Tabelle 2, 3). In einigen Fällen war es jedoch schwierig, mit der Analysesoftware zwischen gesundem und krankem Pflanzengewebe zu unterscheiden. Wenn zum Beispiel die Triebspitzen viel Anthocyan ausbildeten, war neben der Referenzeinstellung eine zusätzliche Einstellung der Farbwerte für die Farbklassendarstellung notwendig. Beim Blatttest wurden für die Referenzeinstellung 42 Farbwerte für die Farbkategorie 'Gesundes Gewebe' (blau) und 22 Farbwerte für die Farbkategorie 'Erkranktes Gewebe' (rot) konfiguriert. Zur Analyse der Triebspitzentests wurden der Farbkategorie 'Gesundes Gewebe' 26 Farbwerte und der Farbkategorie 'Erkranktes Gewebe' 19 Farbwerte zugewiesen.

o Blatttest:

Im Blatttest bildeten sich an den Blättern nach Inokulation braune bis graugrüne Läsionen, die sich während des Inkubationszeitraumes von der Basis beginnend über das Blatt ausbreiteten und bei hoch anfälligen Genotypen das gesamte Blatt einnahmen (Abbildung 1). Die beste Unterscheidung der Anfälligkeit der Genotypen war 8 Tage nach der Inokulation (Messpunkt 3) möglich. Zu diesem Messpunkt variierte das kranke Gewebe bezogen auf die Gesamtblattfläche im Durchschnitt von 8,90 % und 81,00 % in den Einzeltests 1, 2 und 3 bzw. von 20,33 % bis 68,76 % über alle drei Blatttests (Tabelle 2). Der Blatttest zeigte eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der drei unabhängigen Einzeltests. Einzeltest 1 und 3 zeigten keine signifikanten Unterschiede, jedoch unterschied sich Blatttest 2 signifikant von Blatttest 1 und 3 (Abbildung 5).

Tab. 2 Mittelwerte (MW) des prozentualen Anteils kranken Gewebes 8 Tage nach Inokulation für den Blatttest (BL) 1, 2 und 3 sowie Gesamtmittelwerte (unterschiedliche Buchstaben in der Spalte zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen, Kruskal-Wallis-Test $p \leq 0,05$); * n=12, ** n=36

Nr.	BL 1 MW (%)*	BL 2 MW (%)*	BL 3 MW (%)*	BL MW ges (%)**
R04	80,60	44,80	81,00	68,76 ^{bc}
R09	28,40	42,60	58,40	42,48 ^{ab}
R102	64,30	49,70	73,40	62,49 ^{bc}
R105	68,00	44,50	64,40	58,96 ^{bc}
R114	45,00	14,50	41,90	33,79 ^a
R120	24,10	8,90	28,10	20,33 ^a
R122	63,10	23,70	33,80	40,20 ^{ab}
R124	23,90	11,30	39,40	24,86 ^a
R128	46,50	28,70	58,10	44,43 ^{ab}
R129	39,30	48,20	52,50	46,67 ^{ab}
R14	49,60	23,10	28,70	33,80 ^a
R18	29,80	14,80	47,00	30,46 ^a
R29	51,10	14,80	52,10	42,90 ^{ab}
R30	53,80	38,80	62,10	51,58 ^{abc}
R31	30,40	19,20	27,90	25,82 ^a
R40	46,80	27,90	47,50	40,72 ^{ab}
R45	51,90	33,00	39,70	41,52 ^{ab}
R51	49,60	22,20	40,90	37,58 ^a
R57	28,30	21,50	54,90	34,89 ^a
R60	35,10	35,70	13,50	28,07 ^a

Das war darauf zurückzuführen, dass zum Messpunkt 3 (8 dpi) im Blatttest 2 aufgrund verzögerten Erregerwachstums das Befallsniveau von Test 1 und 3 noch nicht erreicht war, sondern erst zum Messpunkt 4 (12 dpi) (Krämer 2010). Nicht signifikante Schwankungen zwischen den Blatttests 1 und 3 sind trotz möglichst einheitlicher Kulturbedingungen und Probenentnahme wahrscheinlich auf das Pflanzenmaterial zurückzuführen. Im Blatttest ließen sich sowohl tolerante (R60, R114, R120) als auch hoch anfällige Genotypen (R04, R102, R105) signifikant unterscheiden (Tabelle 2, Abbildung 1).

o **Triebspitzentest:**

Im Triebspitzentest bildeten sich während der Inkubationszeit sowohl am Spross als auch an den Blättern braune bis dunkelbraune oder graugrüne Läsionen. Die größten Unterschiede in der Anfälligkeit wurden 14 Tage nach der Inokulation beobachtet. Die Läsionen variierten 14 Tage nach Inokulation bezogen auf die gesamte Triebspitze in den Einzeltests 1, 2 und 3 durchschnittlich von 16,40 % bis 82,00 % bzw. über alle drei Triebspitzentests von 22,11 % bis 72,78 % (Tabelle 3, Abbildung 2). Der Triebspitzentest zeigte eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der drei unabhängigen Einzeltests. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Triebspitzentest 1, 2 und 3 (Abbildung 6). Nicht signifikante Schwankungen zwischen den Einzeltests sind trotz möglichst einheitlicher Kulturbedingungen und Probenentnahme wahrscheinlich auf das Pflanzenmaterial zurückzuführen. Im Triebspitzentest ließen sich sowohl tolerante (R114, R120) als auch hoch anfällige Genotypen (R04, R09, R102, R105) unterscheiden (Tabelle 3, Abbildung 2).

Tab. 3 Mittelwerte (MW) des prozentualen Anteils kranken Gewebes 14 Tage nach Inokulation für den Triebspitzentest (TR) 1, 2 und 3 sowie Gesamtmittelwerte (unterschiedliche Buchstaben in der Spalte zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen, Kruskal-Wallis-Test $p \leq 0,05$); # n=10, ## n=30

Nr.	TR 1 MW (%)#	TR 2 MW (%)#	TR 3 MW (%)#	TR MW ges (%)##
R04	82,00	77,00	53,80	70,94 ^{bc}
R09	78,00	74,50	65,90	72,78 ^{bc}
R102	63,50	66,20	66,40	67,27 ^{bc}
R105	76,90	78,00	51,10	68,66 ^{bc}
R114	35,60	27,60	33,40	32,21 ^a
R120	24,90	25,10	16,40	22,11 ^a
R122	44,40	77,30	78,00	66,56 ^b
R124	47,70	35,10	64,20	49,00 ^{ab}
R128	53,70	43,30	46,40	45,06 ^{ab}
R129	41,50	51,90	54,70	49,27 ^{ab}
R14	54,30	46,00	45,20	48,50 ^{ab}
R18	67,00	57,00	46,60	56,86 ^b
R29	57,20	32,30	35,40	41,65 ^{ab}
R30	54,50	45,10	45,90	48,50 ^{ab}
R31	47,70	35,00	41,20	41,27 ^{ab}
R40	64,40	50,80	58,90	58,04 ^b
R45	42,40	55,40	51,00	49,58 ^{ab}
R51	74,10	51,30	58,40	61,28 ^b
R57	67,60	66,90	64,80	66,42 ^b
R60	32,30	42,90	54,60	43,28 ^{ab}

o **Vergleich der Biotests:**

In beiden Biotests war im Gegensatz zu Aussagen der Kultivateure und zur Literatur (Kamoen & Heursel 1983, Bundessortenamt 2000) der Standard 'Ganda' (R09) stärker anfällig als 'Mevrouw Gerard Kint' (R18), wobei 'Ganda' zu den stark anfälligen Genotypen zählte und 'Mevrouw Gerard Kint' zu den moderat anfälligen. Resistenz gegen *C. scoparium* wurde bei den untersuchten Genotypen nicht gefunden, jedoch war es möglich, zwischen toleranten (R114, R120) und hoch anfälligen Genotypen (R04, R102, R105) zu unterscheiden (Abbildung 1, 2, 4, Tabelle 2, 3). Der Genotyp R09, der sich im Triebspitzentest als hoch

anfällig zeigte, war im Blatttest nur moderat anfällig, was wahrscheinlich auf abweichende Mittelwerte im Blatteinzeltest 1 zurückzuführen ist.

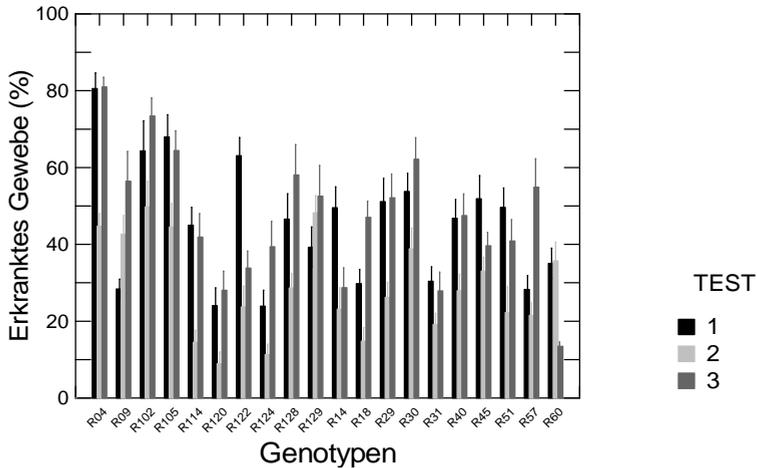


Abb. 1 Prozentualer Anteil erkrankten Gewebes der *Rhododendron*-Genotypen im Blatteinzeltest 1, 2 und 3

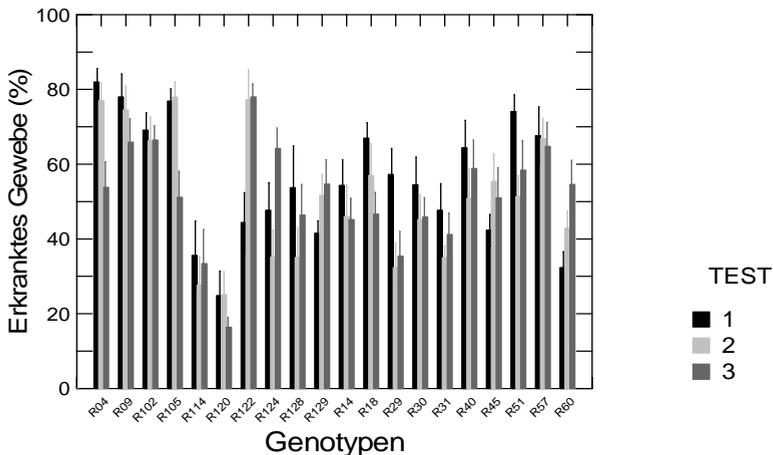


Abb. 2 Prozentualer Anteil erkrankten Gewebes der *Rhododendron*-Genotypen im Triebspitzeneinzeltest 1, 2 und 3

In den vorliegenden Untersuchungen war der Triebspitzentest besser reproduzierbar als der Blatttest, da es beim Triebspitzentest keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einzeltests gab (Abb. 6), jedoch beim Blatttest sich Einzeltest 2 von Einzeltests 1 und 3 signifikant unterschied (Abbildung 5). Die statistischen Analysen zeigten eine geringe Korrelation zwischen Blatt- und Triebspitzentest (p-Wert 0,615) (Tabelle 5).

o **Jungpflanzenentest:**

Der durchschnittliche systemische Befall variierte in den Jungpflanzenentests 1, 2 und 3 von 0,00 % bis 97,62 % sowie von 4,56 % bis 81,81 % über alle drei Jungpflanzenentests (Tabelle 4). Er zeigte eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der drei unabhängigen Einzeltests (Abbildung 7). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einzeltests 1 und 3, jedoch unterschieden sich beide signifikant

vom Einzeltest 2 (Abbildung 7). Eine Unterscheidung von toleranten (R60, R102, R114) und hoch anfälligen Genotypen (R09, R122, R124) war möglich (Abbildung 3, Tabelle 4). Genauso wie in den Biotests war der Standard 'Ganda' (R09) stärker anfällig als 'Mevrouw Gerard Kint' (R18).

Tab. 4 Mittelwerte (MW) des prozentualen Anteils kranken Gewebes 42 Tage nach Inokulation für den systemischen Befall im Jungpflanzentest (JP) 1, 2 und 3 sowie Gesamtmittelwerte (unterschiedliche Buchstaben in der Spalte zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen, Kruskal-Wallis-Test $p \leq 0,05$); ⁺ n=13-23, ⁺⁺ n=53-68

Nr.	JP sys 1 MW (%) ⁺	JP sys 2 MW (%) ⁺	JP 3 sys MW (%) ⁺	JP sys MW ges (%) ⁺⁺
R04	44,44	39,13	38,98	40,85 ^{bc}
R09	92,31	63,64	89,47	81,81 ^d
R102	2,27	2,27	12,50	5,68 ^a
R105	48,75	2,78	21,67	24,40 ^{ab}
R114	12,50	0,00	1,19	4,56 ^a
R120	37,50	31,82	41,67	36,99 ^{bc}
R122	78,41	82,35	84,72	81,83 ^d
R124	48,81	78,13	97,62	74,85 ^d
R128	27,38	15,22	50,00	30,87 ^{bc}
R129	15,91	41,30	47,83	35,01 ^{bc}
R14	48,86	14,13	56,25	39,75 ^{bc}
R18	73,81	15,91	32,14	40,62 ^{bc}
R29	73,68	27,94	48,81	50,14 ^{bc}
R30	38,75	23,08	76,32	46,05 ^{bc}
R31	55,00	51,92	15,91	40,94 ^{bc}
R40	65,91	63,75	29,76	53,14 ^{cd}
R45	45,00	50,00	95,00	63,33 ^{cd}
R51	59,52	31,82	68,18	53,17 ^{cd}
R57	17,86	30,43	4,55	17,61 ^{ab}
R60	20,45	7,50	2,63	10,20 ^a

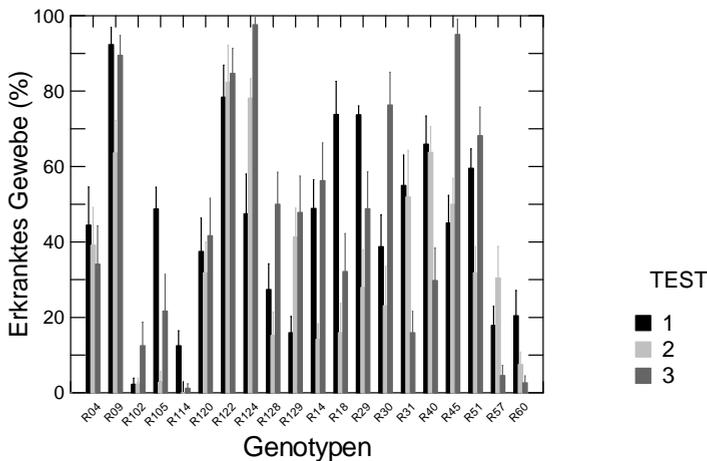


Abb. 3 Prozentualer Anteil erkrankten Gewebes der *Rhododendron*-Genotypen im Jungpflanzeneinzeltest 1, 2 und 3

o **Vergleich Biotests und Jungpflanzenzest:**

Die Biotests mit Blättern bzw. Triebspitzen ermöglichten eine schnelle und zerstörungsfreie Prüfung von *Rhododendron*-Genotypen auf die Anfälligkeit gegen *C. scoparium*. Um von den Ergebnissen der Biotests Rückschlüsse auf die Anfälligkeit von Ganzpflanzen ziehen und Aussagen zum Wirt-Pathogen-System treffen zu können, wurden die Ergebnisse der beiden Biotests mit den Ergebnissen des Jungpflanzenzests verglichen. Die statistische Analyse zeigte keine Korrelation zwischen den Biotests und dem Jungpflanzenzest, wobei die Ergebnisse des Triebspitzenzests besser denen des Jungpflanzenzests entsprachen als die des Blattzests (Tabelle 5).

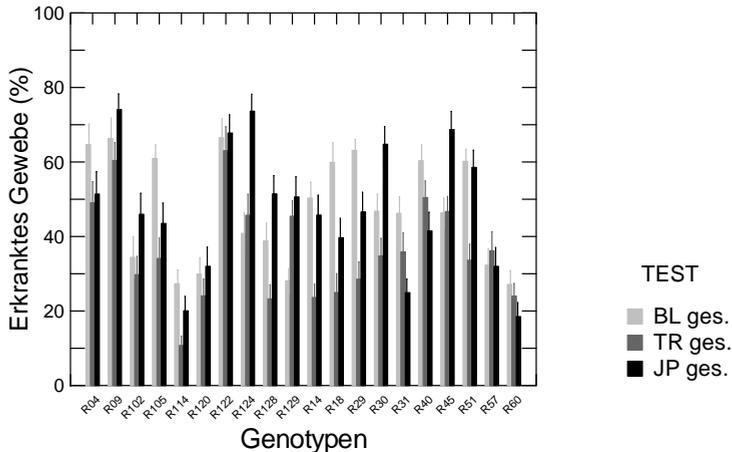


Abb. 4 Prozentualer Anteil erkrankten Gewebes der *Rhododendron*-Genotypen (Gesamtmittelwerte) im Vergleich der Testmethoden Blatt (BL), Triebspitze (TR) und Jungpflanze (JP)

Bezüglich der Testergebnisse einzelner Genotypen gab es Übereinstimmungen oder Unterschiede zwischen Biotests und Jungpflanzenzest (Tabelle 2, 3, 4, Abbildung 4). Genotyp R102 war z.B. in beiden Biotests hoch anfällig, im Jungpflanzenzest jedoch tolerant. Dem ähnlich zeigte R04 im Jungpflanzenzest eine moderate Anfälligkeit, war aber in beiden Biotests sehr anfällig. Dagegen ließ sich die hohe Anfälligkeit von R09 vom Triebspitzen- und Jungpflanzenzest im Blatttest nicht reproduzieren. Der Genotyp R60 war in beiden Biotests moderat anfällig, fiel im Jungpflanzenzest jedoch durch seine tolerante Reaktion gegen den Erreger auf. R120 zeigte in beiden Biotests die geringste Anfälligkeit und war im Jungpflanzenzest ebenfalls nur moderat anfällig. Herausragend war der Genotyp R114, der bei allen drei Testmethoden eine sehr geringe Anfälligkeit aufwies.

Ausgehend von den Ergebnissen aller drei Testmethoden ist für die Resistenzevaluierung einer großen Anzahl von Genotypen bei *Rhododendron* der Triebspitzenzest zu empfehlen, da er gut reproduzierbar ist, eine Differenzierung in tolerante und stark anfällige Genotypen ermöglicht und besser als der Blatttest das System 'ganze Pflanze' (Abbildung 4, Tabelle 5) repräsentiert.

Zur Verifizierung resistenter oder toleranter Genotypen ist ein weiterer Test ganzer Pflanzen wie z.B. bewurzelter Stecklinge unabdingbar. Mit der zunächst für die Möhre etablierten digitalen Bildanalyse (Nothnagel & Krämer 2007) steht nun für das Wirt-Pathogen-System *Rhododendron-Cylindrocladium* in Kombination mit dem Triebspitzenzest eine gut adaptierte, zerstörungsfreie Evaluierungsmethode zur Verfügung, die ebenso für weitere Untersuchungen von *Rhododendron*-Pathogenen oder Pathogenen anderer Zierpflanzen genutzt werden kann.

Mit allen drei Testmethoden wurden die gegen *C. scoparium* toleranten *Rhododendron*-Genotypen R60, R114 und R120 identifiziert (Abbildung 4, Tabelle 2, 3, 4), die züchterisch zur Verbesserung des Toleranzniveaus gegen *C. scoparium* genutzt werden können.

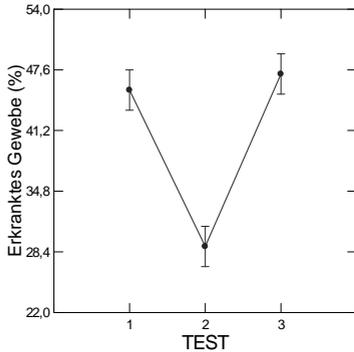


Abb. 5 Vergleich der Blatttests 1 bis 3 (ANOVA)

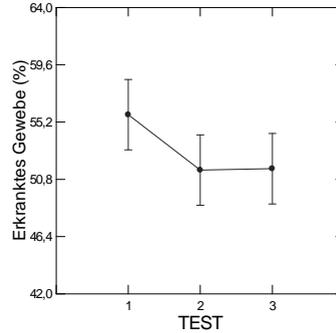


Abb. 6 Vergleich der Triebspitzentests 1 bis 3 (ANOVA)

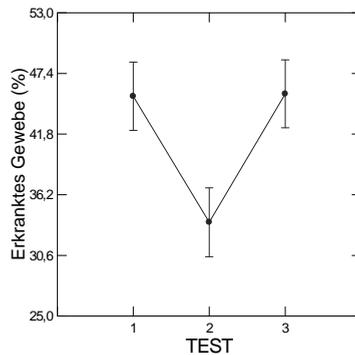


Abb. 7 Vergleich der Jungpflanzenentests 1 bis 3 (ANOVA)

Tab. 5 Korrelationsanalyse (Pearson-Korrelation-Matrix) der drei Methoden Blatttest (8 dpi), Triebspitzentest (14 dpi), Jungpflanzenentest (42 dpi)

Blatttest Mittelwert gesamt	Triebspitzentest Mittelwert gesamt	Jungpflanzenentest Mittelwert gesamt
1,000		
0,615	1,000	
-0,128	0,236	1,000

Danksagung

Die Autoren möchten sich für die Bereitstellung des *Cylindrocladium*-Isolats bei Ulrike Brielmaier-Liebetanz sowie für die technische Assistenz bei den Resistenzevaluierungen bei Dagmar Franke, Martina Malorny, Elke Zjaba, Mandy Püffeld, Nicole Biemüller, Jaqueline Große und Felix Langer herzlich bedanken. In gleicher Weise danken die Autoren den Mitgliedern des Züchtungsausschusses der Azerca, dem Rhododendron-Park Bremen, den Botanischen Sammlungen in Pirna-Zuschendorf sowie der Lehr- und Versuchsanstalt für Gartenbau Rostrup/Bad Zwischenahn für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials.

Literatur

- Backhaus, G.F. & Neubauer, C., 1996: *Cylindrocladium scoparium* – Gefährlicher Krankheitserreger an Moorbeetpflanzen. Rhododendron und immergrüne Laubgehölze – Jahrbuch **1996**: 78-93
- Bundessortenamt, 2000: Beschreibende Sortenliste Topfazalee. 2. ed. Landbuch-Verlag, Hannover: 59, 95
- De Keyser, E., De Riek, J. & Heungens, K., 2008: Development of supporting techniques for pot azalea (*Rhododendron simsii* hybrids) breeding focused on plant quality, disease resistance and enlargement of the assortment. Acta Hort. **766**: 361-366
- Hunter, B.B. & Barnett, H.L., 1970: Growth and sporulation of species and isolates of *Cylindrocladium*. Mycologia **70**: 614-635
- Kamoen, O. & Heursel, J., 1983: *Cylindrocladium scoparium*. Gb + Gw **30**: 783-784
- Morgan, A. P., 1892: Two new genera of hyphomycetes. The Botanical Gazette **17**: 190-192
- Krämer, R., 2010: mündliche Mitteilung, Julius Kühn-Institut, Quedlinburg
- Nothnagel, T. & Krämer, R., 2007: Establishment of a digital image analysis system for resistance tests against various carrot pathogens. 32nd International Carrot Conference, Bordeaux, September 5-7, 2007: 98
- Plaschil, S. & Krämer, R., 2010: A digital image analysis system (DIAS) for assessment of bioassays on *Rhododendron simsii* against *Cylindrocladium scoparium*. Acta Hort. **855**: 221-224
- Stegmann, W., 1988: Untersuchungen zur Pathogenese, Epidemiologie und Bekämpfung der Stammgrundfäule an *Rhododendron simsii* (*Cylindrocladium scoparium*). Dissertation Universität Hannover
- Systat Software, Inc., 2009: *SYSTAT 13*. Chicago, CA: Systat Software, Inc.

Forschungsergebnisse zur Sternrußtauresistenz bei Rosen

Scientific results on the resistance of roses to the black spot disease

Lühmann, Ann-Katrin; Terefe, Diro; Kohlenberg, Max; Linde, Marcus; Debener, Thomas
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzengenetik, Molekulare Pflanzenzüchtung,
Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover
Tel.: 0511 762 3345; E-Mail: linde@genetik.uni-hannover.de

DOI: 10.5073/jka.2011.433.010

Zusammenfassung

Sternrußtau, verursacht durch den hemibiotrophen Ascomyceten *D. rosae*, ist weltweit eine der wichtigsten Krankheiten an Rosen im Freiland. Mindestens 13 verschiedene Rassen des Pathogens wurden bisher beschrieben. Resistenzen gegen *D. rosae* sind vor allem in Rosenarten zu finden. Die genetische Diversität von *D. rosae* Populationen aus Deutschland hängt entscheidend vom Alter der Wirtspopulation, deren genetischer Diversität und Behandlung mit Pflanzenschutzmitteln ab. Durch die Verbreitung und Durchmischung, vor allem durch den Menschen gibt es in weltweiten Proben nur sehr geringe Unterschiede in den *D. rosae* Genotypen. In 141 Proben aus 12 Ländern konnten keine zu den deutschen SSR Allelen abweichende Allele gefunden werden. Bisher wurden drei Resistenzgene gegen *D. rosae* (*Rdr1* bis *Rdr3*) beschreiben, wobei *Rdr1* bei weitem am besten charakterisiert wurde. Das Resistenzgen *Rdr1* gegen die Rasse DortE4 konnte durch Feinkartierung auf drei BAC-Klonen lokalisiert werden. Durch die komplette Sequenzierung dieser BACs wurden neun RGAs des TIR-NBS-LRR-Typs als mögliche Kandidaten innerhalb einer 220kb Region entdeckt. Diese weisen eine Sequenzähnlichkeit von ca. 90% zueinander auf. Durch RNAi-Silencing-Experimente und Expressionsanalysen an zwei resistenten Genotypen konnte die Anzahl der Kandidatengene auf fünf reduziert werden. Mit einer transienten Komplementation des anfälligen Genotyps Paris Charme mit Vollängenklonen dieser fünf Kandidaten konnte *muRdr1-H* als das aktive *Rdr1*-Resistenzgen identifiziert werden.

Stichwörter: Ascomycet, Rassen, genetische Diversität, *Rdr1*, TIR-NBS-LRR

Abstract

Blackspot, caused by the hemibiotrophic ascomycete *D. rosae*, is one of the world's most important diseases of roses in the field. At least 13 different races of the pathogen have been described. Resistances to *D. rosae* are mainly found in rose species. The genetic diversity of *D. rosae* populations from Germany depends critically on the age of the host population, their genetic diversity and treatments with pesticides. Only very small differences in the *D. rosae* genotypes from different countries were detected, mainly caused by the distribution by man. In 141 samples from 12 countries no differing SSR alleles to the ones detected in Germany could be found. So far, three resistance genes to *D. rosae* (*Rdr1* to *Rdr3*) have been described, with *Rdr1* as the best characterized. *Rdr1* acting against the race DortE4 was localized by fine mapping to three BAC clones. Through complete sequencing of these BACs nine RGAs of the TIR-NBS-LRR-type were discovered as potential candidates within a 220kb region. These show sequence similarity of about 90% to each other. Silencing by RNAi experiments and expression analysis of two resistant genotypes reduced the number of candidate genes to five. With transient complementation of the susceptible genotype Pariser Charme with full-length clones of these five candidates *muRdr1-H* could be identified as the active RDR1 resistance gene.

Keywords: ascomycete, races, genetic diversity, *Rdr1*, TIR-NBS-LRR

Einleitung

Diplocarpon rosae Wolf, der Sternrußtau an Rosen oder im Englischen 'black spot' genannt, ist neben dem Echten Mehltau (*Podoshiera pannosa*) sowie dem Falschen Mehltau (*Peronospora sparsa*) eines der bedeutendsten Pathogene an Rosen. Weitere bedeutende pilzliche Pathogene, welche vor allem an Gartenrosen zu finden sind, sind der Rosenrost (*Phragmidium* spp.) und die Blattfleckenkrankheit *Elsinoe rosarum* (anamorphe Form: *Sphaceloma rosarum*). In Gartenrosenbeständen gehört der Sternrußtau zu den am stärksten verbreiteten pilzlichen Krankheiten. Der Name Sternrußtau ergibt sich aufgrund der Symptome, die er an befallenen Rosen verursacht. Der Erreger verursacht erst Chlorosen und dann Nekrosen, die sich sternförmig auf den Blättern ausbreiten. Die mit Sternrußtau befallenen Blätter fallen ab, wodurch sich die Pflanzenentwicklung verzögert. Die Bildung von neuen Trieben wird mit einer geringeren Frostresistenz in Verbindung gebracht. Einige Sorten verlieren ihre Blätter durch den Sternrußtau komplett und somit auch ihren Zierwert in den Gärten.

Taxonomie

Die Gattung *Diplocarpon* (Abbildung 1) umfaßt neben *D. rosae* fünf Arten die als Pflanzenpathogene hauptsächlich Wirte aus der Familie der *Rosaceae* besiedeln, wie z.B. *D. mali* auf *Malus* oder *D. earlianum* auf den Gattungen *Fragaria* und *Potentilla* (Hawksworth et al. 1995). Im Lebenszyklus von *D. rosae* dominiert die asexuelle Vermehrung des Pilzes (Abbildung 2). Diese beginnt ungefähr 24 bis 48 h nach der Infektion, mit der Keimung der Konidien in Wassertröpfchen auf den Rosenblättern (Drewes-Alvarez, 2003). Optimale Temperaturen für die Keimung und das anschließende Wachstum des Pilzes in seinem Wirt liegen bei 18 bis 21 °C (Frick, 1943). Die Konidien bilden Keimschläuche mit Appressorien und dringen durch die Kutikula in das Blatt ein. Nach ca. zwei Tagen beginnen die Hyphen sich zu verzweigen und penetrieren die Epidermiszellen. Ungefähr 7 bis 12 Tagen nach der Infektion bilden sich Acervuli, in denen die doppelzellige Konidien gebildet werden. Nach deren Freisetzung können diese dann neue Blätter infizieren. Der sexuelle Vermehrungszyklus des Pilzes wurde bisher nur sehr selten beobachtet (Frick, 1943; Knight und Wheeler, 1977 und 1978). Die Verbreitung des Sternrußtaus erfolgt vor allem durch die Übertragung der Konidiosporen durch Wassertropfen auf neue Wirtsblätter. Dazu müssen befallene Blätter, Pflanzen oder Pflanzenteile in die Nähe der neuen Wirte transportiert werden um dann eine Übertragung durch Spritzwasser zu ermöglichen.

Reich	<i>Fungi</i>
Unterreich	<i>Dikarya</i>
Stamm	<i>Ascomycota</i>
Substamm	<i>Pezizomycotina</i> O. E. Eriksson und K. Winka, 1997
Klasse	<i>Leotiomycetes</i> O. E. Eriksson und K. Winka, 1997
Ordnung	<i>Helotiales</i> Nannf., 1932
Familie	<i>Dermateaceae</i> Fr., 1849
Gattung	<i>Diplocarpon</i> F. A. Wolf
Art	<i>Diplocarpon rosae</i> F. A. Wolf

Abb. 1 Taxonomische Einordnung von *Diplocarpon rosae* (aus Lühmann 2010).

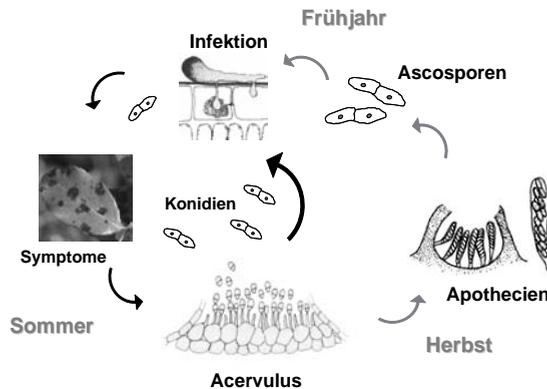


Abb. 2 Lebenszyklus von *Diplocarpon rosae*. Dargestellt ist sowohl der asexuelle (links) als auch der sexuelle (rechts) Vermehrungszyklus. (aus Lühmann, 2010)

Rassenstruktur

Für eine klare Unterscheidung physiologischer Rassen müssen die Untersuchungen mit Einsporisolen durchgeführt werden, um sicher zu stellen, dass die jeweiligen Reaktionen der Wirtspflanze nur durch einen Genotypen des Erregers ausgelöst wurden. Erste Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe wurden von Debener et al. (1998) durch Inokulationen eines Differentialsortiments von zehn verschiedenen Rosengenotypen mit 15 verschiedenen Einsporisolen aus Deutschland durchgeführt. Dadurch konnten 5 physiologische Rassen von *Diplocarpon rosae* voneinander differenziert werden. Unabhängig davon wurden bereits vorher vier Rassen in Kanada (Svejda und Bolton, 1980), sieben Rassen in Mississippi (Spencer und Wood, 1992 a, b), und später vier Rassen in England (Yokoya et al., 2000) charakterisiert. Dies geschah aber jeweils mit anderen Differentialsortimenten und Isolaten. Whitaker et al. (2010) verwendete viele bereits in diesen Arbeiten genutzte Einsporisolate und Rosengenotypen zusammen mit weiteren eigenen (Whitaker et al., 2007) und erstellte ein umfassendes Rassenschema (Abbildung 3). In eigenen aktuellen Analysen haben wir neun weitere Einsporisolate aus verschiedenen Ländern mit einem erweiterten Differentialsortiment nach Whitaker et al. (2010) untersucht. Dabei konnten wir zwei Isolate als neue Rassen definieren und sieben in das Rassenschema von Whitaker einordnen. Davon wurden fünf der Rasse 5 nach Whitaker zugeordnet. Zieht man aber die Ergebnisse mit nur drei weiteren Rosengenotypen in Betracht, so können von den fünf mindestens vier als weitere, andere Rassen definiert werden (Abbildung 3). Es zeigt sich also, dass mit einer Erweiterung der Isolatsammlungen von *D. rosae* und/oder einer Vergrößerung des Differentialsortiments immer mehr Rassen unterschieden werden können. Dies spricht für einen gewissen Prozentsatz an sexueller Fortpflanzung des Pilzes, die zu dieser Rassendiversität führt. Resistenzen gegen *D. rosae* sind vor allem in den Rosenarten zu finden. Unter diesen gibt es einige, die über mehrere Jahre im Feld und in künstlichen

Inokulationen, eine vollständige Resistenz gegen *D. rosae* zeigten. Hierzu zählen auch die tetraploiden Arten *R. bella*, *R. californica*, *R. caudata*, *R. majalis* und *R. nanthamnus* die für Einkreuzungen der Resistenz in die Kultursorten geeignet wären (Schulz et al., 2009). Es gibt allerdings auch unter den in den Differentialsortimenten getesteten Rosensorten einzelne, wie die Sorte 'Mrs. Doreen Pike', die gegen alle bisher verwendeten Isolate resistent sind. Hierbei handelt es sich um eine stark gefüllte, mehrfachblühende Sorte, die vom sonstigen Habitus sehr ähnlich zu *R. rugosa* ist.

	Br-26	Ab-13	Ab-8	X-104	X-130	X-51	X-122	K-967	X-105
Caramba	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Pariser-Charme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Heckenzauber	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Baby-Love	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Climbing-Allgold	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Mermaid	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mrs.-Doreen-Pike	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chorale	+	+	+	+	+	+	+	-	+
George-Vancouver	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Hansa	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Knockout	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Rasse-nach-Whitaker-etal.(2010)	2	5	5	5	5	5	10	neu	neu

	Br-26	Ab-13	Ab-8	X-104	X-130	X-51	X-122	K-967	X-105
93/27-02	-	-	-	+	+	-	+	-	-
88/124-46	-	+	+	-	-	-	-	+	-
93/99-01	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Rasse-nach-Kohlenberg(2011)	2	14-?	15-?	16-?	16-?	17-?	10	12	13

Abb. 3 Rassenstruktur von *D. rosae* (nach Kohlenberg, 2011)

Genetische Diversität

Neben der Identifizierung von Rassen haben wir uns auch mit der genetischen Diversität von *D. rosae* mit Hilfe von molekularen Markern beschäftigt. Dabei haben wir zum Einen detailliert die Diversität in großen Rosenpopulationen in Deutschland betrachtet, und zum Anderen angefangen die Diversität in weltweit gesammelten Stichproben zu vergleichen (Lüthmann, 2010). Für die Populationsanalysen in Deutschland haben wir ca. 950 Proben aus 13 Rosensammlung genommen. Für die meisten Populationen wurden zwei umfangreiche Proben in einem Zeitraum von drei Jahren genommen. Die Gendiversität nach Nei wurde für alle Proben nach der Analyse von 14 SSR Loci ermittelt (Abbildung 4). Aus den Ergebnissen der Analysen geht eindeutig hervor, dass sich das Alter der Rosenpopulation auf die Diversität der auf ihr wachsenden Sternrußtaupopulationen auswirkt. *D. rosae* Populationen aus den älteren Rosenbeständen, weisen auch die höchsten Gen-Diversitäten auf. Die Populationen mit den niedrigsten Gen-Diversitäten wurden auf den Testfeldern der Rosenzüchter gefunden. Dies lässt sich durch das geringe Alter der Rosenpopulationen auf diesen Felder erklären. Die Pflanzen bleiben zur Selektion auf diesen Feldern höchstens drei Jahre stehen, in den meisten Fällen sogar nur zwei Jahre. Zu den ältesten Rosenanpflanzungen gehört aber nicht nur die Rosensammlung aus Kassel-Wilhelmshöhe, auf der schon über 100 Jahre vor der neuen Bepflanzung im Jahr 1978 Rosen angebaut wurden, sondern auch die Sammlung des Europarosariums in Sangerhausen, das seit dem Jahr 1903 besteht. Die Gen-Diversität der Sternrußtaupopulation in Sangerhausen ist jedoch mit 0,14 eine der niedrigsten aller untersuchten Populationen. Das Alter der Wirtspopulation kann die Entwicklung der Diversität also nicht alleine erklären. Auch andere, relativ alte Sammlungen haben Sternrußtaupopulationen mit relativ geringen Gen-Diversitäten, wie z.B. die beiden Rosengärten in Hannover die seit 1951 bzw. 1966 bestehen. Die geringe Diversität in diesen alten Population ist mit großer Wahrscheinlichkeit durch den dort häufig stattfindenden Einsatz von Fungiziden bedingt. Im Vergleich dazu, wurden in Kassel-Wilhelmshöhe oder dem Testfeld in Ruthe (Hannover), seit Beginn der Neupflanzung

keinerlei Fungizide und auch keine anderen Pflanzenschutzmittel verwendet. Die Fungizide wirken als genetischer Flaschenhals auf die gesamte Pathogenpopulation. Nur ein kleiner Teil der Population bleibt nach der Anwendung von Fungiziden bestehen. Dieser besitzt dann eine wesentlich geringere genetische Diversität als die Ausgangspopulation.

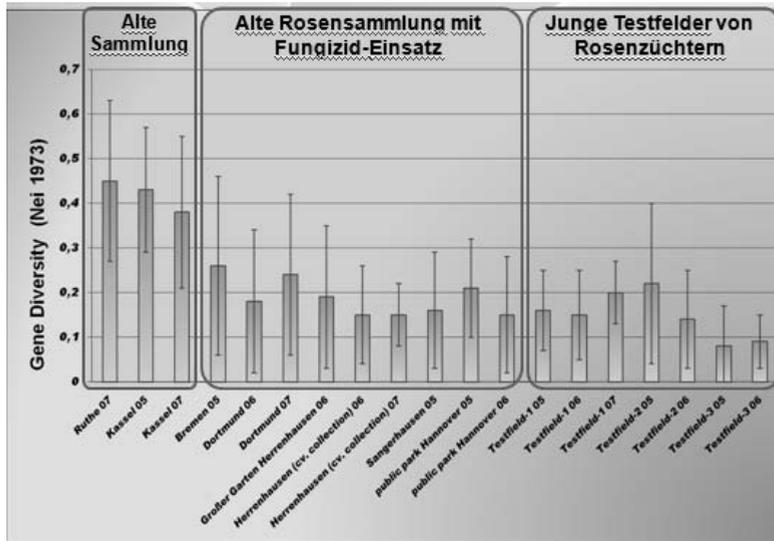


Abb. 4 Gen-Diversität nach Nei für *D. rosae* Proben aus Rosensammlungen in Deutschland

Um die weltweite Diversität des Pathogens *D. rosae* einschätzen zu können, wurden neben den Populationen innerhalb Deutschlands weltweit auch kleinere Populationen und einzelne Stichproben analysiert (Lühmann, 2010). Insgesamt wurden außerhalb Deutschlands 141 Proben in 12 Ländern gesammelt und später mit 13 SSR-Loci analysiert. Besonders auffällig ist, dass in keiner der Proben andere Bandenmuster aufgetreten sind, als die, die auch schon aus den SSR-Analysen von Populationen innerhalb Deutschlands sowie den Analysen der Einsporisolate bekannt waren. Daher kann darauf geschlossen werden, dass sich die Genotypen weltweit nicht besonders stark unterscheiden. Eine Verbreitung und Durchmischung, vor allem durch den Menschen, ist daher sehr wahrscheinlich. Genaue Angaben können bisher aber noch nicht gemacht werden, da teilweise nur kleine Stichproben gesammelt wurden.

Resistenzen und Resistenzgene

Bei der Resistenz gegenüber Pathogenen ist Grundsätzlich zwischen einer basalen bzw. horizontalen und einer spezifischen bzw. vertikalen Resistenz zu unterscheiden. Während es sich bei einer basale Resistenz meist um eine rassenunspezifische und meist nicht komplette, also quantitative, Resistenz handelt, kommt es bei einer vertikalen Resistenz zu einer spezifischen Interaktion von Produkten der Avirulenzgene (Avr-) im Pathogen mit den Produkten der Resistenzgene (R-) im Wirt. Sind korrespondierende Avr- und R-Gene in Pathogen und Wirt vorhanden, kommt es zu einer Resistenzreaktion im Wirt, die oft mit einer Hypersensitiven-Reaktion (HR) einhergeht. Dabei überlagern sich basale und spezifische Resistenzen in der Antwort des Wirts auf das Pathogen. Beide Typen der Resistenz wurden auch für die Interaktion von Rosen mit *D. rosae* gezeigt. Hinweise auf quantitative, basale Resistenz in Rosen gibt es z. B. durch die Untersuchungen von Xue und Davidson (1998), Bleichert und Debener (2005) und Whitaker und Hokanson (2009).

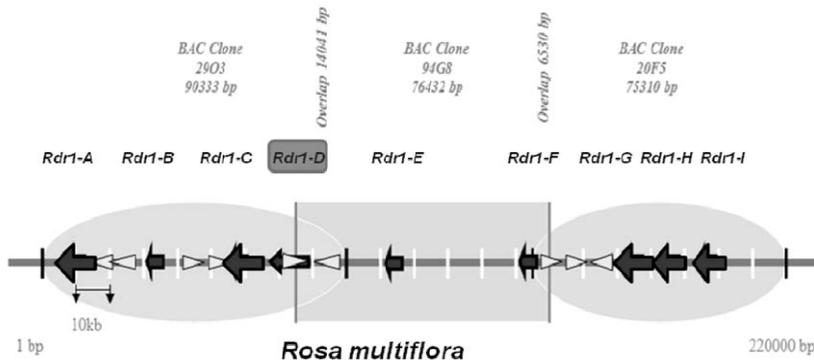


Abb. 5 Physikalische Position der *Rdr1* Genregion mit Anordnung der RGAs: Rote Pfeile repräsentieren die 9 RGAs die durch Sequenzanalyse auf diesen *R. multiflora* BACs erkannt wurden. Gelbe Dreiecke zeigen Copia-Elemente innerhalb dieses Intervalls. Die Pfeile und Dreiecke zeigen die Ausrichtung des RGAs und der Copia-Elemente im Contig

Aber auch Resistenzgene die eine spezifische Resistenz gegen einzelne Rassen von *D. rosae* vermitteln, wurden schon detailliert untersucht. Im Jahr 1998 (von Malek und Debener) wurde *Rdr1* (Resistenzgen *D. rosae* 1) als erstes Resistenzgen beschrieben. Dieses aus *R. multiflora* in tetraploide Gartenrosen eingekreuzte Gen, vermittelt eine Resistenz gegen das aus Deutschland stammende Isolat DortE4. Es wurde in der Folge detailliert in verschiedenen *R. multiflora* Hybridpopulationen molekular kartiert und charakterisiert. Mit Hilfe einer Bulk-Segregant-Analyse wurde eine Feinkartierung der Region um *Rdr1* mit 816 AFLP Primerkombinationen durchgeführt. Marker ohne Rekombination und in einer Distanz von 0,18cM um das Gen herum konnten dadurch lokalisiert werden (Hattendorf et al. 2004). In denselben Analysen konnte auch ein weiterer Resistenzloкус, *Rdr2*, der mit dem Isolat DüA3 interagiert, mit Hilfe der BSA kartiert werden. Dieser zeigte eine enge Kopplung an der *Rdr1* Locus, und wurde somit ebenfalls auf der Kopplungsgruppe 1 der Population 94/1 kartiert (Von Malek et al. 2000, Hattendorf et al. 2004). Mit Hilfe von degenerierten Primern konnten auch eine Reihe von Resistenzgenanaloga vom NBS-LRR-Typ in der Nähe dieser Resistenzgene und auf den anderen Kopplungsgruppen detektiert werden. In 2010 wurde dann das dritte Resistenzgen gegen Sternrußtau (*Rdr3*) von Whitaker et al. kartiert und publiziert. Dieses segregiert unabhängig von *Rdr1* und *Rdr2* und vermittelt eine Resistenz gegen ein Nordamerikanisches Isolat der Rasse 5. Ebenfalls mit Hilfe einer BSA konnten eng gekoppelte molekulare Marker von Whitaker et al. identifiziert werden.

Die weitaus meisten Erkenntnisse liegen für das 1998 erstmals beschriebene *Rdr1* Resistenzgen gegen die Rasse DortE4 vor (von Malek und Debener). In den folgenden Jahren wurde das Gen in zwei *R. multiflora* Populationen kartiert, und dem unteren Teil der Gruppe 1 zugeordnet (Hattendorf et al. 2004). Der *Rdr1* Locus wird durch mehrere Resistenz assoziierte Markern wie Resistenzgenanaloga (RGA, isoliert mit degenerierten Primern mit einem Kandidatengen-Ansatz) und von mehreren NBS Marker umgeben. Für die markergestützte Isolierung von *Rdr1* wurden weiterhin zwei große BAC-Bibliotheken für *R. rugosa* (Kaufmann et al., 2003) und *R. multiflora* aufgebaut. Diese resultierten in einem *R. multiflora* BAC Contig aus fünf überlappenden BACs von 250kb rund um den *Rdr1* Locus (Biber et al., 2010). Durch eine Feinkartierung mit den Inokulations- und Markerdaten von rund tausend Nachkommen konnten wir die Region rund um *Rdr1* auf ca. 0,1cM auf jeder Seite eingrenzen. *Rdr1* wurde dadurch auf den drei BAC-Klonen 2903, 94G8 und 20F5 des *R. multiflora* Genotyps 88/124-46, der homozygot für *Rdr1* ist, lokalisiert (Abb. 5). Diese drei BACs wurden nachfolgend vollständig sequenziert. Die Sequenzanalysen zeigten für den *Rdr1* Locus die Anwesenheit von neun RGAs des TIR-NBS-LRR-Typs (*muRdr1-A* bis *-I*) als mögliche Kandidaten für das Resistenzgen innerhalb einer 220kb Region (Terefe et al., 2010). Da die einzige bekannte Funktion von Genen dieser Klasse die Vermittlung einer Resistenz ist und kein anderer Resistenzgen mit

ähnlicher Sequenz konnte in der Region erkannt wurden, war anzunehmen, dass eines der 9 Gene das funktionellen *Rdr1*-Gens ist. Neben den neun RGAs wurde eine Reihe von Copia-Elementen in dieser Region des Genoms detektiert. *Rdr1-D* konnte Aufgrund der Sequenzinformationen als Kandidat ausgeschlossen werden, da es ein 7kb Retrotransposon im nicht codierenden Bereich seines ersten Intron enthielt (Kaufmann et al. 2010). Um das aktive *Rdr1* TIR-NBS-LRR Gen aus den 8 Kandidaten zu identifizieren, haben wir vier Ansätze parallel durchgeführt (Terefe et al. 2011): Als Erstes wurde ein RNAi-Silencing-Experiment der gesamten Genfamilie im resistenten *R. multiflora* Genotyp 91/100-5 durchgeführt. Das verwendete RNAi-Konstrukt hier basierte auf dem Vektor p9U10-RNAi. In dieses wurde ein 1098 bp-Fragment aus der hochkonservierten NBS Region von Exon 2 von *muRdr1-H* kloniert, das eine Ähnlichkeit von 86-96% zu alle anderen *muRdr1* Genen aufwies (lokale Ähnlichkeiten über Strecken > 100 bp wurden mehr als 95%). Mit dieser transienten Expression konnte allerdings kein komplettes Silencing der Genfamilie in dem resistenten Genotyp erreicht werden. Es zeigte sich zwar eine schwach anfällige Interaktion mit Hyphenwachstum, aber keine Bildung von Acervuli durch das Isolat DortE4 von *D. rosae*. Eine Behandlung des anfälligen Genotyps Pariser Charme mit diesem Konstrukt, rief eine signifikant erhöhte Anfälligkeit dieses Genotyps hervor. Man kann daher vermuten, dass auch in anfälligen Genotypen eine geringe quantitative Resistenz vorliegt, die wahrscheinlich durch überwundene Resistenzgene hervorgerufen wird. Zur Verringerung der Zahl der potentiellen *Rdr1*-Kandidaten, wurde als Zweites eine Expressionsanalyse der einzelnen Kandidatengene mit RT-PCR in verschiedenen Geweben (Blätter, Blüten und Wurzeln) der resistenten Rosengentypen 88/124-46 und 91/100-5 durchgeführt. Es wurden dazu spezifische und generelle Primer für all *muRdr1* Kandidaten auf cDNA der resistenten Genotypen angewendet. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass *muRdr1-A*, *C*, *G*, *H* und *I* in Blätter und Blüten exprimiert wurden, während *muRdr1-D*, *-E* und *-F* überhaupt keine Expression zeigten (Tabelle 1). Einer der Kandidaten, *muRdr1-B*, war nicht in Blütenblätter des Genotyps 88/124-46 exprimiert und gar nicht im Genotyp 91/100-5. Daher konnten mit *muRdr1-B*, *D*, *E* und *F* vier weitere Genkopien als mögliche Kandidaten für *Rdr1* ausgeschlossen werden.

Tab. 1 Expression der *Rdr1* Kandidatengene (CGs) A bis I in drei Geweben der resistenten *R. multiflora* Genotypen 88/124-46 und 91/100-5.

CGs	88/124-46			91/100-5	
	Leaves	Petals	Roots	Leaves	Petals
A	+	+	+	+	+
B	+	-	+	-	-
C	+	+	+	+	+
D	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-
G	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+
I	+	+	+	+	+

Als dritter Ansatz wurden Vollängenklone, inklusive der Regulationselemente im 5' und 3' Bereich der Gene, von 8 RGAs (ohne *Rdr1-D*) durch Restriktion der drei BAC-Klone (29O3, 94G8, 20F5) hergestellt. Die Sequenzen hatte eine Länge von ca. 10 bis 19 kb und enthielten 3kb der genomischen DNA oberhalb des putativen ATG Startcodons und > 900 bp unterhalb des putativen Stopcodons. Diese Klone wurden mit dem pBINPLUS-Vector in *E. coli* und *Agrobacterium* GV3101 transformiert. Alle 8 Kandidaten konnten

erfolgreich in *N. benthamiana* heterolog exprimiert und mit verschiedenen Primern nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass alle für die Expression nötigen Sequenzen im 5'- und 3'-Bereich der Klone vorhanden waren. Mit diesen Konstrukten in *Agrobacterium* GV3101 wurde dann eine transiente Komplementation des anfälligen Genotyps Paris Charme durchgeführt. Dazu wurden Blätter von Pariser Charme mit Hilfe einer Spritze mit einer Suspension aus Agrobakterien, welche jeweils eins der acht verschiedenen Konstrukte enthielten, und Konidien von dem Isolat DortE4 von *D. rosae* infiltriert. Als Kontrollen wurden zum Einen nur Konidien aus derselben Suspension infiltriert und zum Anderen Konidien zusammen mit Agrobakterien desselben Stamms, die ein GUS Konstrukt enthielten. In neun unabhängigen Experimenten wurden jeweils 20 Infiltrationen für jede der Behandlungen durchgeführt. Vier Tage nach Infiltration wurde das Wachstum von *D. rosae* DortE4 mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie an den entfärbten Blättern dokumentiert. In allen Experimenten gab es zur Keimung der Konidien und zum Wachstum von *D. rosae* Hyphenclustern im Blattgewebe. Es wurden dabei keine Unterschiede in der Morphologie der Hyphen festgestellt. In allen neun wiederholten Experimenten führte aber die Ko-Infiltration der Konidien mit *muRdr1-H* zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der Hyphencluster auf im Durchschnitt 54% im Vergleich zur GUS-Kontrolle (Abbildung 6). Hingegen zeigte das Konstrukt mit *muRdr1-A* nur in drei von neun Experimenten eine signifikante, aber geringere Reduktion der Anfälligkeit. In einem vierten experimentellen Ansatz bewirkte eine Ko-Infiltration von *muRdr1-H* mit einer anderen Rasse von *D. rosae* ebenfalls keine Reduktion der Anfälligkeit. Es zeigte sich in nachfolgenden Analysen auch kein additiver Effekt von *muRdr1-H* und *muRdr1-A*. Dies zeigt, dass *muRdr1-H* spezifisch mit dem Isolat *DortE4* interagiert, und das funktionelle *Rdr1* Gen ist, welches die Resistenz eines anfälligen Genotyps gegen diese Rasse wieder herstellt (Terefe et al. 2011).

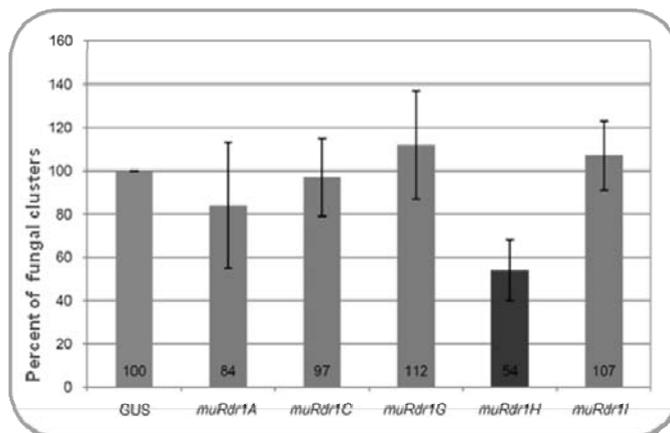


Abb. 6 Ergebnisse der Transienten Expression der verschiedenen *muRdr1* Konstrukte in Pariser Charme. Dargestellt ist der Prozentsatz an Hyphenclustern aus neun Wiederholten Experimenten in Vergleich zur GUS-Kontrolle.

Danksagung

Diese Arbeiten wurden unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Fördernummern DE 511/4-1 und DE 511/4-2. Ann-Katrin Lühmann wurde im Rahmen eines von der Aif geförderten Projekts unterstützt. Aneela Yasmin wurde gefördert durch ein Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD).

Literatur

- Biber, A., Kaufmann, H., Linde, M., Spiller, M., Terefe, D., und Debener, T. 2010: Molecular markers from a BAC contig spanning the *Rdr1* locus: a tool for marker-assisted selection in roses. *Theor. Appl. Genet.* **120**, 765–773.
- Blechert, O. und Debener, T., 2005: Morphological characterization of the interaction between *Diplocarpon rosae* and various rose species. *Plant Pathology* **54** (1) 82-90.
- Debener, T., Drewes-Alvarez, R. und Rockstroh, K., 1998: Identification of five physiological races of black spot, *Diplocarpon rosae*, Wolf on roses. *Plant Breeding* **117** (3), 267-270.
- Drewes-Alvarez, R., 2003: *Disease/Black spot*. In: Encyclopedia of rose science. Eds.: Roberts, A.V., Debener, T., Gudin, S., Oxford, Elsevier Academic Press.
- Frick, L., 1943: Untersuchungen über Biologie und Pathogenität von *Diplocarpon rosae* (Lib.) Wolf. *Phytopathol. Z.* **14**: 525-591.
- Hattendorf A, Linde M, Mattiesch L, Kaufmann H. und Debener T, 2004: Genetic analysis of rose resistance genes and their localization in the rose genome. *Acta Hort* **651**, 123–130
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler D.N., 1995: *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungus*. CAB International, Wallingford, UK.
- Knight, C. und Wheeler, B.E.J., 1978: *Germination of Diplocarpon-Rosae on Different Rose Cultivars*. *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology* **91** (4), 346-354.
- Knight, C. und Wheeler, B.E.J., 1977: *Perennation of Diplocarpon-Rosae on Rose Leaves*. *Transactions of the British Mycological Society* **69**, 385-389.
- Kaufmann H, Mattiesch L, Lörz H, Debener T, 2003: Construction of a BAC library of *Rosa rugosa* Thunb. and assembly of a contig spanning *Rdr1*, a gene that confers resistance to black spot. *Mol Genet Genomics* **268**, 666–674.
- Kaufmann, H., Yasmin, A., Biber, A., Terefe, D., Kühn, A. und Debener, T., 2010: Cloning and analysis of *Rdr1*, a black spot resistance gene from roses. *Acta Hort.* **870**, 191-196
- Kohlenberg, M., 2011: Molekulare und phytopathologische Charakterisierung von Sternrußtaurassen an Rosen. Bachelorarbeit Leibniz Universität Hannover
- Lühmann, A.-K. , 2010: Genetische Diversität des Sternrußtaus (*Diplocarpon rosae*) an Rosen. Dissertation Leibniz Universität Hannover
- Schulz, D.F., Linde, M., Blechert, O. und Debener, T., 2009: Evaluation of Genus *Rosa* Germplasm for Resistance to Black Spot, Downy Mildew and Powdery Mildew. *European Journal of Horticultural Science* **74** (1), 1-9.
- Spencer, J.A. und Wood, O.W., 1992a: Resistance of Selected Rose Cultivars to Variants of *Marssonina rosae* in Mississippi. *Journal of Environmental Horticulture* **10**, 235-238.
- Spencer, J.A. und Wood, O.W., 1992b: Response of Selected Old Garden Roses to Seven Isolates of *Marssonina rosae* in Mississippi. *Journal of Environmental Horticulture* **10**, 221-223.
- Svejda, F. J. und Bolton, A. T., 1980: Resistance of rose hybrids to three races of *Diplocarpon rosae*. *Canadian Journal of plant pathology* **2**, 23-25.
- Terefe, D., Biber, A., Yasmin, A., Kaufmann, H., und Debener, T., 2010: Comparative genomic analysis of sequences around the *Rdr1* locus in resistant and susceptible rose genotypes. *Acta Hort.* **870**, 197–204.
- Terefe, D., Yasmin, A., Le, T.L., Kaufmann, H., Biber A., Kühn, A., Linde, M. und Debener, T., 2010: Mining Disease-Resistance Genes in Roses: Functional and Molecular Characterization of the *Rdr1* Locus. *Frontiers in Plant Science* **2**, 1-12.
- Von Malek, B. und Debener, T., 1998: Genetic analysis of resistance to blackspot (*Diplocarpon rosae*) in tetraploid roses. *Theoretical and Applied Genetics* **96** (2), 228-231.
- Von Malek, B., Weber, W.E., Debener, T., 2000: Identification of molecular markers linked to *Rdr1*, a gene conferring resistance to black spot in roses. *Theoretical and Applied Genetics* **101** (5-6), 977-983.
- Whitaker, V. M. und Hokanson, S. C., 2009: Partial resistance to black spot disease in diploid and tetraploid roses: general combining ability and implications for breeding and selection. *Euphytica* **169** (3), 421–429.
- Whitaker, V.M., Bradeen, J.M., Debener, T. , Biber, A. und Hokanson, S.C., 2010: *Rdr3*, a novel locus conferring black spot disease resistance in rose: genetic analysis, LRR profiling, and SCAR marker development. *Theor. Appl. Genet.* **120**, 573-585.
- Xue A.G. und Davidson C.G, 1998: Components of partial resistance to black spot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf) in garden roses. *HortScience* **33** (1), 96-99.
- Yokoya, K., Kandasamy, K.I., Walker, S., Mandegaran, Z. und Roberts, A.V., 2000: Resistance of roses to pathotypes of *Diplocarpon rosae*. *Annals of Applied Biology* **136** (1), 15-20.

Autoren

	A			M	
Altmann, Thomas		40	Mibus, Heiko		18
	B			O	
Balko, Christiane		29	Ordon, Frank		29
Bartelmann, Anne		29		P	
Boehm, Robert		33	Plaschil, Sylvia		46
	D			S	
Debener, Thomas		55	Seddig, Sylvia		29
Dohm, Andrea		33	Serek, Margrethe		18
	H		Spellerberg, Burkhard		12
Harrer, Siegfried		5		T	
Hendriks, Ludger		33	Terefe, Diro		55
Hiep, Heinrich		4		V	
	K			W	
Kohlenberg, Max		55	Von Broock, Reinhard		4
Krämer, Reiner		46	Von Kameke, Kartz		4
Krato, Theresa		33			
	L				
Linde, Marcus		55	Winkelmann, Traud		18
Lühmann, Ann-Katrin		55			

Veröffentlichungen des JKI

Das **Julius-Kühn-Archiv** setzt die seit 1906 erschienenen Mitteilungshefte, eine Reihe von Monographien unterschiedlichster Themen von Forschungsarbeiten bis zu gesetzlichen Aufgaben fort. Alle bisher erschienenen Ausgaben sind OPEN ACCESS kostenfrei im Internet zu lesen.

Öffentlichkeit und Fachwelt versorgen wir zusätzlich mit verschiedenen Informationsangeboten über alle Aspekte rund um die Kulturpflanzen. Hierfür stehen verschiedene Broschüren, Faltblätter, Fachzeitschriften und Monographien aber auch verschiedene Datenbanken als Informationsressourcen zur Verfügung.

Für die Allgemeinheit sind vor allem die Faltblätter gedacht, die über Nützlinge im Garten, aber auch über spezielles wie den Asiatischen Laubholzbockkäfer informieren. Außerdem ist der regelmäßig erscheinende Jahresbericht allgemein interessant, vor allem mit den umfassenden Artikeln zu besonderen Themen, die Sie aber auch im Internet auf den thematisch dazugehörigen Seiten finden.

Seit 2009 wird vom Julius Kühn-Institut als wissenschaftliches Fachorgan das **Journal für Kulturpflanzen – Journal of Cultivated Plants** (vormals Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes) monatlich herausgegeben (<http://www.journal-kulturpflanzen.de>).

Weiterführende Informationen über uns finden Sie auf der Homepage des Julius Kühn-Instituts unter <http://www.jki.bund.de> im Bereich Veröffentlichungen.

Spezielle Anfragen wird Ihnen unsere Pressestelle (pressestelle@jki.bund.de) gern beantworten.

Anschrift für **Tauschsendungen**:

Please address **exchanges** to:
Adressez **échanges**, s'il vous plait:
Para el **canje** dirigirse por favor a:

Informationszentrum und Bibliothek
Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Königin-Luise-Straße 19
D-14195 Berlin, Germany
E-Mail: ib@jki.bund.de

Erstes Symposium Zierpflanzenzüchtung in Quedlinburg, 15.-16. November 2011

Zierpflanzen prägen mit ihrer großen Artenvielfalt das Bild unserer Gesellschaft. Die Zierpflanzenzüchtung schafft die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Zierpflanzenproduktion. Im Mittelpunkt des Symposiums stehen Inhalte zu Forschung und Entwicklung rund um die Zierpflanzenzüchtung. Die beleuchteten Themen reichen von pflanzengenetischen Ressourcen über Züchtungsmethoden und molekulare Markertechniken bis zu Verfahren der Pflanzenphänotypisierung.

First Symposium on Ornamental Plants in Quedlinburg, November 15th-16th, 2011

Ornamental plants shape the picture of our society with their large variety of species. Ornamental plant breeding creates the conditions for a successful ornamental plant production. The symposium is centred on themes of research and development in ornamental plant breeding. The topics range from plant genetic resources, breeding methods and molecular marker techniques to procedures of plant phenotyping.