

132-Brielmaier-Liebetanz, U.; Idczak, E.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

Plasmopara obducens* an *Impatiens walleriana

Plasmopara obducens on *Impatiens walleriana*

Plasmopara obducens an *Impatiens walleriana* wurde in Deutschland zum ersten Mal 2007 beobachtet und stellt ein zunehmendes Problem dar. Befall tritt vorwiegend im Freiland auf, wurde vereinzelt aber auch in der Anzucht unter Glas beobachtet. Neben der Verwendung als Beet- und Balkonpflanze im Haus- und Kleingarten spielt *I. walleriana* im öffentlichen Grün sowie auf Friedhöfen eine bedeutende Rolle. Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln ist in diesen Bereichen nicht opportun, der Anbau widerstandsfähiger Sorten wäre eine gute Lösung. Es stellte sich die Frage, ob sich in dem breiten Sortiment von *I. walleriana* Sorten finden, die widerstandsfähig gegen diesen Falschen Mehltaupilz sind. Ein Testsystem zur Prüfung auf Widerstandsfähigkeit wurde entwickelt und 52 Sorten getestet.

Impatiens-Sämlinge im 2 - 4 Blattstadium wurden mit einer Suspension frisch geernteter Sporangien der Dichte 105/ml inokuliert. Mit einem Feinzerstäuber wurden per Druckluft 5 ml Suspension über 25 Pflanzen so versprüht, dass möglichst auch die Blattunterseiten benetzt waren. Die Pflanzen wurden in Kleingewächshäusern in einer Klimakammer bei 15 °C und 12 Std. Licht inkubiert. Während der ersten drei Tage blieben die Abdeckhauben geschlossen. Die Auswertung erfolgte zwei Wochen nach der Inokulation durch Ermittlung der Anzahl Pflanzen mit Sporangienbildung.

Spätestens zehn Tage nach Inokulation war ein weißer Rasen von Sporangienträgern blattunterseits sichtbar. Die Blattoberseiten erschienen matt und fahl, die Blattränder rollten sich nach unten ein. Einige Sorten wiesen dunkel verfärbte Zonen auf den Blättern auf. Wenige Tage nach dem Sichtbarwerden der Sporangienträger waren Oogonien in den Impatiens-Blättern nachweisbar.

Alle 52 Sorten erwiesen sich in zwei Versuchsdurchgängen als hoch anfällig. Die 50 Sämlinge einer Sorte verhielten sich weitgehend homogen. Nur vereinzelt zeigten Pflanzen innerhalb einer Sorte keine Krankheits-symptome. Das Ergebnis weist darauf hin, dass das Resistenzpotenzial in Bezug auf *P. obducens* im aktuellen Impatiens-Sortiment gering ist. Da der Erreger mit Hilfe von Oogonien im Boden überdauern kann, ist von einem Nachbau auf Befallsflächen dringend abzuraten.

132a-Würdig, J.; Flachowsky, H.; Peil, A.; Hanke, M.-V.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

Erzeugung cisgener Apfelpflanzen (*Malus x domestica* BORKH.) mit Resistenz gegenüber dem Erreger des Apfelschorfes *Venturia inaequalis*

Der Kulturapfel (*Malus x domestica* BORKH.) gehört zu den wirtschaftlich wichtigsten Obstarten weltweit. Von mehreren hundert Apfelsorten sind nur einige wenige auf dem Weltmarkt vertreten, da diese aufgrund ihrer Fruchtqualität, dem Geschmack und der Lagerfähigkeit von den Anbauern, der Vermarktung und den Verbrauchern favorisiert werden. Diese Sorten sind jedoch anfällig gegenüber verschiedenen Krankheiten wie dem Apfelschorf, dem Feuerbrand und dem Apfelmehltau. Resistenzquellen für die Apfelmehltau sind vor allem in verschiedenen Wildapfelarten bekannt. So wurde beispielsweise der Wildapfelgenotyp *Malus floribunda* 821 als Donor für das Schorfresistenzgen *Rvi6* (*HcrVf2*) in verschiedenen Zuchtprogrammen benutzt. Die klassische Züchtung ist beim Apfel jedoch sehr zeitaufwendig und kostenintensiv. Die Anwendung gentechnischer Verfahren könnte hier von Vorteil sein, um Züchtungsprozesse zielgerichteter, schneller und effektiver realisieren zu können. Besondere Bedeutung wird dabei vor allem der Cisgen-Technologie beigemessen. Bei dieser Technologie werden Gene unter Kontrolle ihrer endogenen regulatorischen Elemente in kreuzbare Arten übertragen. Die dabei entstehenden Pflanzen sind denen aus der klassischen Züchtung sehr ähnlich.

Die Zielstellung der vorgestellten Arbeit ist die Erzeugung cisgener Pflanzen von Weltmarktsorten, die das Schorfresistenzgen *Rvi6* enthalten und somit resistent gegenüber dem Erreger des Apfelschorfs *Venturia inaequalis* sind. Für diese Aufgabenstellung wurde ein geeigneter Transformationsvektor entwickelt der für den Gentransfer mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* verwendbar ist. Der Transformationsvektor enthält neben dem *Rvi6* Gen, welches unter Kontrolle seiner endogenen Promotor- und Terminatorsequenz steht, eine Rekombinationskassette. Diese Rekombinationskassette wird von Erkennungssequenzen für eine FLP-Rekombinase flankiert und beinhaltet die zwei Markergene *nptII* und *dao1*, sowie das *flp* Rekombinasegen, welches von einem hitzeinduzierbaren Promotor kontrolliert wird. Nach einer erfolgreichen Selektion wird mit einer Hitzebehandlung das *flp* Gen induziert. Die Aktivität der FLP Rekombinase führt in der Folge zu einer zielgerichteten Entfernung der Rekombinationskassette vom Apfelgenom. Für die Transformation wurden die kommerziell wichtigen Sorten 'Pinova', 'Mariri Red', 'Kanzi', 'Gala-Mitchgla', 'Novajo', 'Red Jonaprince' und

'Baigent Brookfield' verwendet. Bisher wurden für vier dieser Sorten transgene Linien erzeugt. Die Integration der transferierten Gene wurde mit PCR bestätigt. Die Expression der Transgene wurde mit RT-PCR unter Standard Anzuchtbedingungen untersucht. Die Anzahl der Integrationsorte wurde mit Southern Blot Analyse bestimmt. Insgesamt konnten vier Linien mit nur einer T-DNA Integration identifiziert werden, welche für eine nachfolgende Hitzebehandlung zur Entfernung der Rekombinationskassette verwendet werden sollen. Um die Funktion des übertragenen Schorfresistenzgens zu untersuchen, wurde ein Schorfresistenztest im Gewächshaus durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Sprosse von den transgenen Linien und von Kontrollpflanzen auf 'Golden Delicious' Sämlinge veredelt. Die Inokulation erfolgte parallel mit Einsporisolen von den *Venturia inaequalis* Rassen 1 und 6. Dazu wurden Konidiensuspensionen mit einer Dichte von $3 \cdot 10^5$ bis $4 \cdot 10^5$ Konidien/ml hergestellt. Als Kontrollen dienten die untransformierten Sorten 'Pinova', 'Gala-Mitchgla', 'Novajo' und 'Baigent Brookfield'. Weitere Kontrollen waren die schorfresistenten Sorten 'Retina' und 'Prima', in welche *Rvi6* über klassische Züchtung eingebracht wurde und die als Rassetester für *Venturia inaequalis* Rasse 6 fungieren. Zusätzlich diente die Sorte 'Golden Delicious' als Kontrolle, da sie der Rassetester für *Venturia inaequalis* Rasse 1 ist. Die Bonitur erfolgte drei Wochen nach Inokulation entsprechend der Klassifizierung von Chevalier et al. (1991). Fast alle mit Rasse 6 inokulierten Pflanzen waren anfällig, was sich in einer starken Sporulation auf der Blattoberfläche zeigte. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen da bekannt ist, dass die *Venturia inaequalis* Rasse 6 die Resistenz, welche durch das *Rvi6* Gen hervorgerufen wird, bricht. Die Inokulation mit Rasse 1 führte zu Symptomen bei den untransformierten Sorten und 'Golden Delicious'. Die schorfresistenten Sorten 'Prima' und 'Retina', sowie zwölf von vierzehn getesteten transgenen Linien wurden als resistent bonitiert. Zwei von vierzehn getesteten transgenen Linien zeigten Symptome. Ursache dafür könnte z. B. eine unvollständige Integration des Schorfresistenzgens sein. Zusammenfassend konnte für jede der vier Sorten mindestens eine resistente transgene Linie identifiziert werden. Die resistenten transgenen Linien werden anschließend einer Hitzebehandlung unterzogen um sich dem Ziel, cisgene schorfresistenter Apfelsorten herzustellen, anzunähern.

Literatur

CHEVALIER, M., Y. LESPINASSE, S. RENAUDIN, 1991: A microscopic study of different classes of symptoms coded by the Vf gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). Plant Pathol. 40, 249 - 256.

132b-Szentgyörgyi, E.¹⁾; Dierend, W.²⁾; Hanke, M.-V.¹⁾; Peil, A.¹⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

²⁾ Hochschule Osnabrück

Identifizierung *Rvi6*-schorfresistenter Kreuzungsnachkommen mittels Markergestützter Selektion und Phänotypisierung der Resistenz

Der durch den Ascomyceten *Venturia inaequalis* hervorgerufene Apfelschorf ist weltweit eine der bedeutendsten pilzlichen Erkrankungen der Gattung *Malus*. Ein Befall mit *V. inaequalis* führt zu einer Reduktion der Blattmasse, einer deutlichen Qualitätsminderung der Früchte sowie vorzeitigem Fruchtfall. Darüber hinaus neigen befallene Früchte zu einer verstärkten Fäulnisbildung, was erhöhte Verluste bei der Lagerung zur Folge hat. Die meisten kommerziell angebauten Apfelsorten sind anfällig gegenüber *V. inaequalis*. Um die Entwicklung des Pilzes zu hemmen, und somit mögliche ökonomische Verluste zu verringern, sind in Deutschland daher jährlich zwischen 17 und 20 Fungizidanwendungen notwendig – in anderen Ländern bis zu 30. Aufgrund der steigenden Nachfrage nach ökologisch bzw. nachhaltig produzierten Lebensmitteln könnte der Einsatz von Fungiziden durch den Anbau Schorf-resistenter Apfelsorten erheblich reduziert werden.

Das *Rvi6*-Gen aus der Wildarten-Akzession *Malus floribunda* 821 stellt das bestuntersuchte und meistgenutzte Resistenzgen in Züchtungsprogrammen dar. Entsprechend der Theorie einer Gen-für-Gen Beziehung vermittelt das *Rvi6*-Gen eine Resistenz gegenüber *V. inaequalis*-Stämmen, welche ein dem *Rvi6*-Gen korrespondierendes Avirulenzgen tragen. Es konnten jedoch schon Schorffrasen identifiziert werden, welche in der Lage sind, die *Rvi6* vermittelte Resistenz zu brechen. Gegenwärtig sind mehr als 70 verschiedene Apfelsorten mit *Rvi6*-Resistenz bekannt, welche jedoch nur teilweise im Erwerbsobstbau etabliert sind.

Untersuchungsgegenstand des Projektes sind ausgewählte Nachkommen von 11 verschiedenen Kreuzungspopulationen schorfanfälliger und *Rvi6*-resistenter Apfelsorten, welche aus dem Züchtungsprogramm der Züchtungsinitiative Niederelbe GmbH & Co kg (ZIN) stammen. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurden Blattproben von 223 Apfel- und Zierapfelklonen mittels Marker-gestützter Selektion auf das Vorkommen des *Rvi6*-Gens untersucht. Dabei konnte das *Rvi6*-Gen bei insgesamt 130 verschiedenen Genotypen nachgewiesen werden. Von 48 der *Rvi6*-positiven Zuchtklone wurden Edelreiser auf die Unterlage M9 veredelt und mit verschiedenen *Venturia inaequalis*-Stämmen inokuliert, um die phänotypische Ausprägung der *Rvi6*-vermittelten Resistenz zu untersuchen.