

132 c-Vogt, I.; Wöhner, T.; Richter, K.; Hanke, M.-V.; Wensing, A.; Flachowsky, H.; Peil, A.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

Nachweis einer Gen-für-Gen Beziehung im Wirt-Pathogensystem *Malus × robusta* 5 – *Erwinia amylovora*

Erwinia amylovora verursacht die Bakteriose Feuerbrand, eine Quarantänekrankheit, welche Pflanzen der Familie der Rosaceae befällt. Die wirtschaftliche Bedeutung dieser Krankheit ist besonders für die Apfelproduktion beträchtlich, da alle bedeutenden Apfelsorten mehr oder weniger anfällig sind. Eine effektive Bekämpfung des Erregers ist bislang nur mit antibiotikahaltigen Pflanzenschutzmitteln möglich. Die Entwicklung von neuen, feuerbrandresistenten Apfelsorten ist damit eines der wichtigsten Ziele in vielen Apfelmehrzüchtungsprogrammen weltweit. Geeignete Resistenzquellen sind vor allem in Wildapfelarten, wie zum Beispiel in der Wildapfelhybride *Malus × robusta* 5 (Mr5), zu finden. Für die erfolgreiche Nutzung dieser Resistenzquelle in der Züchtung ist jedoch das Verständnis über den zugrunde liegenden Resistenzmechanismus von Vorteil.

Als ein wichtiger Faktor in der Pathogenabwehr von Mr5 konnte das Effektorprotein AvrRpt2_{EA} identifiziert werden. Dieses Protein wird über ein Typ-III-Sekretionssystem von *E. amylovora* in die Wirtspflanze injiziert und dort von einem Resistenzprotein erkannt, wodurch die Pathogenabwehr induziert wird. AvrRpt2_{EA} wurde erstmals von Zhao et al. (2006) beschrieben und ist homolog zum Effektor AvrRpt2 von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Um die Beteiligung des *avrRpt2*_{EA} Gens in der Wirt-Pathogen-Beziehung Mr5 – *E. amylovora* zu untersuchen, wurde Mr5 mit der *avrRpt2*_{EA} Deletionsmutante ZYRKD3-1 und dem entsprechenden Wildstamm Ea 1189 infiziert. Dabei verursachte die Deletionsmutante im Gegensatz zum Wildtyp deutliche Nekrosen mit einer durchschnittlichen Rate von über 50 %. Ähnlich starke Symptome konnten auch nach Inokulation mit einzelnen Wildtypstämmen wie z. B. dem Stamm Ea 3049 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ist Mr5 jedoch gegenüber den meisten Feuerbrandstämmen resistent. Diese Beobachtungen gaben einen ersten Hinweis für die Existenz einer Gen-für-Gen Beziehung im Wirt-Pathogen-System Mr5 und *E. amylovora* und waren Anlass für nähere Untersuchung des AvrRpt2_{EA} Gens. Zur Aufklärung der Ursachen für die unterschiedliche Reaktion von Mr5 auf verschiedene Stämme des Erregers erfolgte die Sequenzierung des *avrRpt2*_{EA} Gens von 22 *E. amylovora*-Stämmen. Bis auf einen Single Nucleotide Polymorphism (SNP), waren alle *avrRpt2*_{EA} Gensequenzen völlig identisch. Dieser Nukleotidaustausch führt zur Ausbildung von zwei verschiedenen Proteinsequenzen, welche an Position 156 entweder ein Cystein oder ein Serin besitzen (S- bzw. C-Allel). Aufgrund der Fähigkeit von Cystein Disulfidbrücken zu bilden, kann der Austausch im *avrRpt2*_{EA} Gen zu einer Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins führen. Das könnte möglicherweise den Erkennungsmechanismus in Mr5 beeinflussen. Für den Nachweis dieses Basenaustausches wurden SNP-Primer entwickelt und an 75 *E. amylovora*-Stämmen getestet. Insgesamt konnten jedoch nur 5 Stämme identifiziert werden, welche das S-Allel tragen. Die Virulenzanalyse verschiedener Stämme zeigt eine Korrelation zwischen dem entsprechenden Allel des Effektors AvrRpt2_{EA} und der Virulenz des Erregerstammes gegenüber Mr5. Stämme die das S-Allel tragen (z. B. Ea 3049) brechen die Resistenz von Mr5, wohingegen Stämme die das C-Allel tragen (z. B. Ea 1189), keine Nekrose hervorrufen. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden komplementierte Stämme der virulenten Deletionsmutante ZYRKD3-1 hergestellt. Hierfür wurden das C- und das S-Allel des *avrRpt2*_{EA} Gens jeweils unter Kontrolle des eigenen Promotors in einen Expressionsvektor kloniert und mittels Elektroporation in die Deletionsmutante transformiert. Die Inokulation von Mr5 zeigt, dass die Komplementation der *avrRpt2*_{EA} Deletionsmutante mit dem avirulenten C-Allel zur Wiederherstellung der Resistenz von Mr5 führt. Hingegen konnte die mit dem virulenten S-Allel komplementierte Mutante die Resistenz von Mr5 weiterhin brechen. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese einer Gen-für-Gen Beziehung im Wirt-Pathogen System Mr5 und *E. amylovora*.

132 d-Bestfleisch, M.¹⁾; Höfer, M.¹⁾; Hanke, M.-V.¹⁾; Flachowsky, H.¹⁾; Richter, K.¹⁾; Schulte, E.²⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

²⁾ Bundessortenamt

Evaluierung von genetischen Ressourcen bei Erdbeeren *Fragaria* spp. auf Resistenz gegenüber *Botrytis cinerea* und *Xanthomonas fragariae*

Die Krankheitserreger *Botrytis cinerea* und *Xanthomonas fragariae* sind von besonderer Bedeutung für den ökologischen Erdbeeranbau, gegen die derzeit keine wirksamen Mittel zugelassen sind. Eine Bekämpfung ist nur mit indirekten pflanzenbaulichen Maßnahmen oder dem Einsatz von Pflanzenstärkungsmitteln möglich. Resistente oder tolerante Sorten mit spezieller Eignung für den ökologischen Anbau wären ein effizienter Ansatz zur Verbesserung des ökologischen Erdbeeranbaus. Im Rahmen der Versuche sollen Erdbeersorten der Deutschen Genbank Obst sowie Erdbeersorten und Erdbeerwildarten der Obstgenbank Pillnitz auf ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber *B. cinerea* und *X. fragariae* getestet werden.

Für die Etablierung des Resistenztests gegenüber *B. cinerea* wurden Methoden zur künstlichen Inokulation von Erdbeerfrüchten an verschiedenen Genotypen entwickelt, die unter standardisierten Bedingungen eine Evaluierung der Resistenz bzw. Toleranz bezüglich des Schaderregers zulassen. Hierfür wurden die pflückreif geernteten Früchte zunächst einer Oberflächensterilisation in Natriumhypochlorit unterzogen, um die Fremdeinwirkung bereits anhaftender Sporen und Keime herabzusetzen. Anschließend wurden die Früchte unter sterilen Bedingungen mit einer Sporensuspension (10^7 CFU/ml) inokuliert und in einer Klimakammer inkubiert. Der Befall wurde nach 2, 4, 6 und 8 Tagen bonitiert. Hierbei wurde eine Boniturskala von 0 (kein Befall) bis 4 (100 % Befall) verwendet. Erste Befallssymptome zeigen sich bei inokulierten Erdbeerfrüchten in Abhängigkeit der Sorte nach 1 bis 3 Tagen. Beginnend am Inokulationspunkt breitet sich das zunächst weiße Mycel innerhalb weniger Tage rasch auf den Früchten aus, verfärbt sich grau und sporuliert erneut. Die größten Unterschiede zwischen den Sorten zeigen sich 6 Tage nach der Inokulation. Je Sorte wurden je nach Verfügbarkeit 15 bis 30 Früchte inokuliert. Hierbei zeigten die Sorten 'Florence', 'Arosa' und 'Darselect' sowie die Zuchtklone '95518' und '98043' eine signifikant geringere Anfälligkeit. Die Sorten 'Mieze Schindler' und 'Senga Sengana' waren am anfälligsten. Resistente Genotypen, welche völlig ohne Symptome waren oder eine echte Abwehrreaktion z. B. in Form einer Hypersensitivitätsreaktion zeigten, konnten bislang nicht identifiziert werden.

Die Resistenz gegenüber *X. fragariae* wurde durch eine gezielte Inokulation der Pflanzen im Gewächshaus ermittelt. Frigo-Pflanzen verschiedener Sorten wurden mit einer Bakteriensuspension (10^9 CFU/ml) auf der Blattunterseite bepinselt. Parallel dazu wurden Versuche durchgeführt, bei denen das Blatt mit einer in Inokulum getauchten Schere angeschnitten wurde. Von jeder Sorte wurden insgesamt 8 bis 9 Pflanzen in einer randomisierten Blockanlage mit insgesamt drei Wiederholungen getestet. Um bestmögliche Infektionsbedingungen zu schaffen, wurde nach der Inokulation die Bildung von Guttationströpfchen gefördert. Dazu wurden die Tische im Gewächshaus zusätzlich, ähnlich wie in einem Folientunnel, mit transparenter Folie abgedeckt und die Luftfeuchtigkeit bei hoher Temperatur stark erhöht. In der darauffolgenden Nacht wurde die Temperatur stark abgesenkt. Der somit erreichte Anstieg des Wurzeldrucks führte zum Öffnen der Hydathoden und zur Bildung von Guttationströpfchen. Dadurch können die *Xanthomonas*-Bakterien über die geöffneten Hydathoden besser in die Pflanze eindringen. Die Bonitur erfolgte jeweils 15, 21, 35 und 62 Tage nach der Inokulation. Dazu wurde eine Boniturskala von 1 (keine Symptome) bis 9 (sehr starke Symptome) verwendet.

Im Ergebnis dieser Versuche wurde festgestellt, dass der beste Infektionserfolg durch Bepinseln erzielt wurde, während die Inokulation durch Anschneiden keine vergleichbaren Ergebnisse lieferte. Von den getesteten Sorten zeigten sich die Sorten 'Clery', 'Diana', 'Donna' und 'Florin' am widerstandsfähigsten und die Sorte 'Malwina' am anfälligsten. Resistente Genotypen wurden bislang nicht identifiziert. Aufbauend auf den Ergebnissen der Resistenztests sollen Eltern ausgewählt werden, mit denen dann Testkreuzungen durchgeführt werden. Mithilfe der Ergebnisse dieser Testkreuzungen sollen Genotypen identifiziert werden, die für eine gezielte Resistenzzüchtung geeignet sind.

133-Taubenrauch, K.; Kühne, T.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsanstalt für Kulturpflanzen

Totalverlust von Fenchelernte durch *Mycosphaerella anethi*-Befall

*Total loss of Fennel yield after *Mycosphaerella anethi*-infestation*

Mycosphaerella anethi ist der bedeutendste samenübertragbare pilzliche Schaderreger im Produktionsanbau von Fenchel. Befallene Pflanzen bleiben bis zur Blüte symptomlos, die Krankheit kann sich danach je nach Witterungsbedingungen explosionsartig entwickeln und zu mäßigen bis sehr starken Ertragsausfällen führen. Der Totalausfall aller Früchte ist möglich. Aus dem Praxisanbau liegen Berichte über massive Ernteaufschläge durch *M. anethi*-Infektionen vor, der Schaden wurde bisher aber niemals dokumentiert. Im Jahr 2010 ist es in einem ökologisch wirtschaftenden Betrieb zum Totalausfall der Fenchelernte durch *M. anethi* gekommen. Der aufgetretene Schaden wurde erstmals wissenschaftlich ausgewertet und dokumentiert, um neue Strategien zur Bekämpfung zu entwickeln. Die Ergebnisse der Untersuchung sollen umfassend dargestellt werden.