

# Pflanzen

## Mit Molekulargenetik gegen Bakterienwelke bei Raigräsern

Roland Kölliker, Bruno Studer, Rolf Krähenbühl, Philipp Streckeisen, Franz Xaver Schubiger, Beat Boller und Franco Widmer, Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, CH-8046 Zürich

Auskünfte: Roland Kölliker, E-Mail: roland.koelliker@art.admin.ch, Fax +41 44 377 72 01, Tel. +41 44 377 71 11

### Zusammenfassung

**B**akterienwelke, verursacht durch das Bakterium *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (*Xtg*), ist eine der wichtigsten Krankheiten von Italienisch Raigras (*Lolium multiflorum* Lam.). Durch gezielte Resistenzzüchtung konnten Sorten geschaffen werden, die durch Bakterienwelke nur wenig geschwächt werden. Trotzdem sind die Resistenzmechanismen weitgehend unbekannt und eine weitere Verbesserung der Resistenz gestaltet sich schwierig. In dieser Arbeit wurden molekulargenetische Methoden eingesetzt, um die Erregerpopulationen zu charakterisieren und die genetischen Grundlagen der Resistenz zu erforschen. Die molekulargenetische Charakterisierung von 30 *Xtg*-Isolaten zeigte eine im Vergleich zu anderen Pathogenen eher geringe genetische Vielfalt. Auch die Virulenz der untersuchten Isolate variierte nur moderat, während signifikante Unterschiede in der Anfälligkeit von drei untersuchten *L. multiflorum*-Sorten festgestellt wurden. Basierend auf einer genetischen Kopplungskarte und künstlicher Infektion im Feld und im Gewächshaus konnte eine Genregion identifiziert werden, welche bis zu 70% der Resistenz in einer Kartierungspopulation erklärte. Zudem konnten weitere Genregionen identifiziert werden, welche an der Kontrolle der Resistenz beteiligt sind, aber einen geringeren Anteil erklärten. Die identifizierten Genregionen bilden eine erste Grundlage für die markerunterstützte Züchtung von gegen Bakterienwelke resistente Sorten.

Die Bakterienwelke der Futtergräser wurde erstmals 1970 an Knaulgras (*Dactylis glomerata*), Wiesenschwingel (*Festuca pratensis*) und Raigras (*Lolium* spp.) in Schweizer Zuchtgärten entdeckt und der Erreger wurde als *Xanthomonas* sp. identifiziert (Egli *et al.* 1975). Bakterienstämme die sich innerhalb einer Art durch ihre Wirtsspezifität unterscheiden, werden als Pathovare bezeichnet. Von den vier *Xanthomonas translucens*-Pathovaren, welche Futtergräser befallen, zeichnet sich *X. translucens* pv. *graminis* (*Xtg*) durch ein breites Wirtsspektrum aus (zum Beispiel *Lolium* spp., *Festuca* spp., *D. glomerata*, *Phleum pratense*, *Phalaris arundinacea*), während sich das Wirtsspektrum der drei anderen Pathovare pv. *phlei*, pv. *poa* und pv. *arrhenateri* auf die jeweilige Gattung beschränkt. Die Bakterien infizieren Pflanzen hauptsächlich durch Wunden

oder Stomata, verursachen Nekrosen und Welkesymptome und können nach einigen Tagen ein komplettes Absterben der Pflanzen verursachen. Die Krankheit ist heute weit verbreitet und wurde in den meisten Ländern Europas, in den USA, in Australien und in Neuseeland beobachtet. In der Schweiz wurden in bis zu 80 % der untersuchten Wiesen und Weiden infizierte Pflanzen gefunden und erhebliche Ertragsverluste durch natürliche Infektion beobachtet (Schmidt 1988). Da der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln im Futterbau generell unerwünscht ist und alternative Bekämpfungsmethoden wie die Desinfektion von Mähbalken zur Verminderung der Krankheitsübertragung nur beschränkt erfolgreich waren (Schmidt 1988), bildet die Resistenzzüchtung das einzig Erfolg versprechende Mittel, um Bakterienwelke in Futtergräsern zu kontrollieren. Tatsächlich er-

möglichte die wiederholte Selektion nach künstlicher Infektion in den letzten zehn bis zwanzig Jahren erhebliche Fortschritte (Boller und Lehmann 1996).

### Molekulargenetische Diagnostik als Ergänzung

Trotz der beachtlichen Erfolge in der Resistenzzüchtung, gibt es noch immer viele offene Fragen. So treten auch in mehrheitlich resistenten Populationen immer wieder anfällige Individuen auf, welche die Leistung einer zukünftigen Sorte beeinträchtigen könnten. Ein besseres Verständnis der Resistenzvererbung und die Identifizierung von Genen, die zur Kontrolle der Resistenz beitragen, können mithelfen, die Züchtung resistenter Sorten effizienter zu gestalten. Molekulargenetische Methoden erlauben eine detaillierte Charakterisierung der Erreger und der Resistenzeigenschaften. Molekulare Marker, die mit Resistenzgenen gekoppelt sind, erlauben zudem ein gezieltes Einkreuzen ausgewählter Resistenzeigenschaften und können die klassische Züchtung ergänzen. Das Ziel dieser Arbeit war, die genetischen Grundlagen der Resistenz gegen Bakterienwelke in Italienisch Raigras zu charakterisieren und insbesondere abzuklären,

■ wie stark sich Erregerpopulationen innerhalb der Schweiz unterscheiden,

■ ob die Resistenz durch viele oder einige wenige Gene kontrolliert wird und

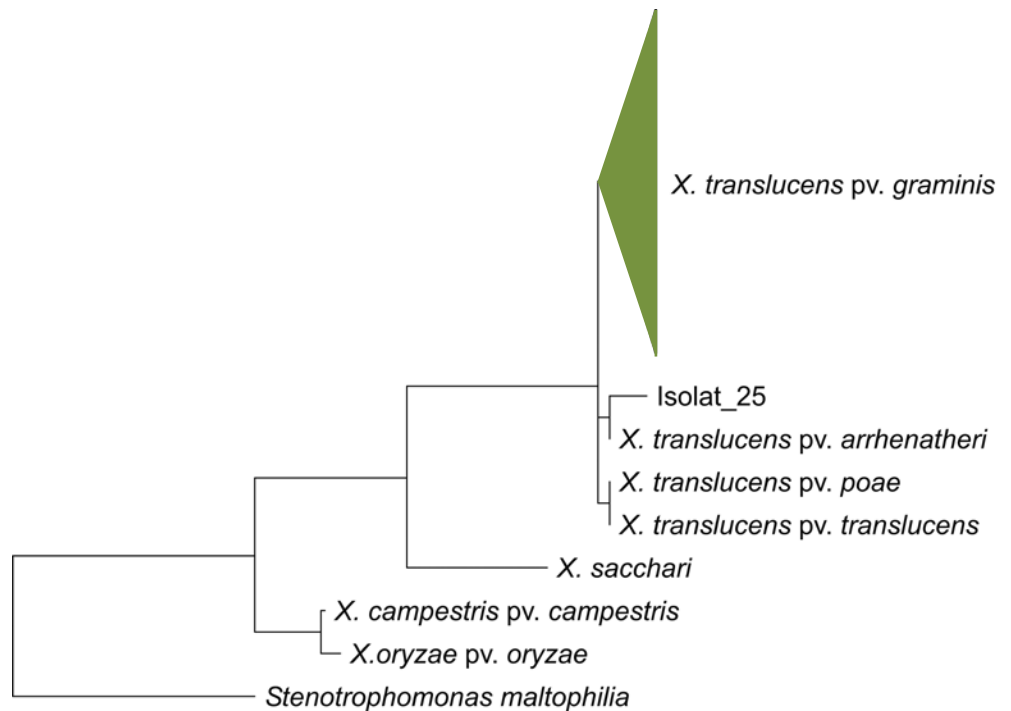
■ wo die Resistenzgene im Italienisch Raigras-Genom lokalisiert sind.

### Charakterisierung der Erreger

Bakterienisolate wurden aus Pflanzen mit deutlichen Bakterienwelke-Symptomen von Wiesen in der ganzen Schweiz gesammelt und als Einzelkolonien auf Glukose-Agar vermehrt. Um sicherzustellen, dass es sich um *Xtg*-Isolate handelt und um die genetische Vielfalt zwischen den Isolaten zu bestimmen, wurden die DNS-Sequenzen eines Markergens (16S ribosomales RNS Gen) von 32 Isolaten verglichen (Kölliker *et al.* 2006). Die Sequenzen von 30 Isolaten zeigten eine sehr hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des *Xtg*-Referenzisolates (*X. translucens* pv. *graminis*) und formten eine klar abgegrenzte Gruppe (Abb. 1). Das Isolat 25 war klar verschieden von den übrigen *Xtg*-Isolaten und konnte auf Grund der Markergen-Sequenz als ein Isolat von *X. t.* pv. *arrhenatheri* (*Xta*) identifiziert werden. Ein einziges Isolat zeigte keine Ähnlichkeit zu *Xanthomonas* und wurde als Kontamination von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Um festzustellen, wie stark sich die als echte *Xtg* identifizierten Isolate genetisch unterscheiden, wurde die AFLP-Methode (Amplified Fragment Length Polymorphism) angewendet, welche sehr feine Unterschiede erfassen kann. Basierend auf 306 AFLP-Markern konnten 24 verschiedene *Xtg*-Genotypen unterschieden werden, doch die genetischen Unterschiede zwischen den Isolaten waren im Vergleich zu anderen Pathogenen gering und nur schwach mit der geographischen Herkunft korreliert (Kölliker *et al.* 2006).

### Unterschiede in der Virulenz

Neben der genetischen Vielfalt wurden auch die Unterschiede in



der Virulenz der einzelnen Isolate untersucht. Je zwölf Pflanzen von den Italienisch Raigras-Sorten Axis, Adret und Ligrande wurden im Gewächshaus mit jedem einzelnen der 30 *Xtg*-Isolate und dem *Xta*-Isolat infiziert. Die Infektion erfolgte nach der von Rechsteiner *et al.* (2006) beschriebenen Methode durch Zurückschneiden der Pflanzen mit einer in Bakteriensuspension ge-

tauchten Schere (Abb. 2). Zwei Wochen nach der Infektion wurden die Bakterienwelke-Symptome mit Hilfe einer Skala von 1 (gesund, keine Symptome) bis 9 (abgestorben) bewertet (Abb. 3). Die durchschnittlichen Befallswerte pro Sorte und *Xtg*-Isolat variierten von 3,0 (*Xtg*\_27, Axis) bis 8,1 (*Xtg*\_17, Adret), während das *Xta*-Isolat mit einem Durchschnitt von 2,3 keine deutlichen Sympto-

**Abb. 1. Ähnlichkeit der *Xtg*-Isolate (grünes Dreieck) mit anderen *Xanthomonas* Bakterien, welche durch den Vergleich von DNS-Sequenzen eines Markergens ermittelt wurde.**



**Abb. 2. Künstliche Bakterienwelke-Infektion im Gewächshaus: Die Pflanzen werden mit einer in Bakteriensuspension getauchten Schere geschnitten und so infiziert. (Foto: Bruno Studer, Agroscope Reckenholz-Tänikon ART)**

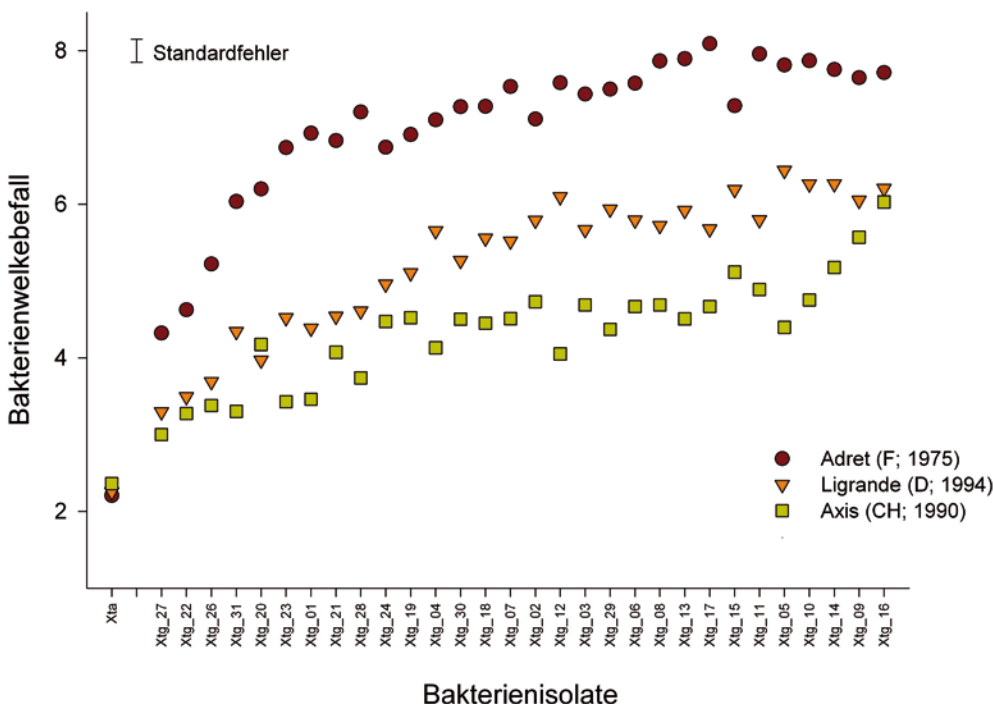


**Abb. 3. Bewertungsskala für Bakterienwelkebefall von gesund (1) oben links bis abgestorben (9) unten rechts (Foto: Bruno Studer, Agroscope Reckenholz-Tänikon ART)**

**Abb. 4. Bakterienwelkebefall von drei Italienisch Raigras-Sorten, welche mit 30 Isolaten von *X. t. pv. graminis* (Xtg) und einem Isolat von *X. t. pv. arrhenatheri* (Xta) infiziert wurden.**

me verursachte (Abb. 4). Die drei Sorten unterschieden sich deutlich bezüglich ihrer durchschnittlichen Anfälligkeit gegenüber allen 30 Xtg-Isolaten. So überlebten nur 27 % der infizierten Pflanzen der Sorte Adret die Infektion. Dieser Prozentsatz lag bei 67 % für Ligrande und 83 % für Axis (Kölliker *et al.* 2006). Die Rangfolge der Sorten war für die verschiedenen Isolate aber sehr ähnlich, was gut mit der vergleichsweise geringen genetischen Vielfalt zwischen den Isolaten überein-

stimmt. Xtg\_29, das Standardisolat, das bei ART routinemässig in der Resistenzzüchtung eingesetzt wird, zeichnete sich durch eine mittlere bis hohe Aggressivität aus (Abb. 4). Die geringe Variation sowohl auf genetischer Ebene als auch bezüglich der Virulenz deutet darauf hin, dass die Auswahl eines bestimmten Isolates für die Resistenzzüchtung und für weitergehende molekulargenetische Charakterisierung der Resistenz nicht entscheidend zu sein scheint.



### Genetische Kartierung

Um Gene, welche die Resistenz gegen Bakterienwelke in Italienisch Raigras kontrollieren, zu identifizieren und zu lokalisieren, wurde eine Kartierungspopulation aus 306 Genotypen aufgebaut. Die Population bestand aus den Nachkommen einer wechselseitigen Paarkreuzung zwischen einer anfälligen Pflanze der Sorte Adret und einer resistenten Pflanze aus dem Zuchtmaterial von Agroscope Reckenholz-Tänikon ART. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen und für die phänotypische Charakterisierung verklont. Für die genetische Charakterisierung wurde von allen Pflanzen genomische DNS extrahiert. Die Kopplungsanalyse mit 51 SSR-Markern (Simple Sequence Repeats) und 467 AFLP-Markern führte zu einer genetischen Karte mit sieben Kopplungsgruppen, entsprechend der Anzahl Chromosomen im haploiden Chromosomensatz von *L. multiflorum* ( $2n=2x=14$ ). Die Kopplungskarte wies eine durchschnittliche Distanz zwischen einzelnen Markern von weniger als zwei Centimorgan aus.

### Infektionsversuche

Die 306 Genotypen der Kartierungspopulation wurden sowohl im Gewächshaus als auch im Feld auf ihre Resistenz gegenüber Bakterienwelke untersucht. Im Gewächshaus wurden vier geklonte Einzelpflanzen jedes Genotyps komplett randomisiert in Einzeltöpfen angezogen und wie oben beschrieben infiziert (Abb. 2). Im Feld wurden drei Wiederholungen pro Genotyp in einem randomisierten Versuch ausgepflanzt. Die Bakterien suspension wurde während des Mähens mit einer Rückenspritze direkt auf den Mähbalken gespritzt (Abb. 5). Für beide Versuche wurde das Standardisolat Xtg\_29 verwendet. Der Xtg-Befall jeder einzelnen Pflanze wurde im Gewächshaus 28 Tage und auf dem Feld 33 Tage nach Be-



fall mit einer Befallsskala von 1 bis 9 bestimmt (Abb. 3).

Sowohl im Gewächshaus als auch im Feld (Abb. 6) beobachteten wir eine grosse Variabilität der Kartierungspopulation bezüglich Resistenz gegen Bakterienwelke. Der Mittelwert lag mit 6,6 im Gewächshaus deutlich höher als im Feldversuch mit 2,8. Eine Erklärung dafür könnte einerseits die ungleiche Infektionsmethode sein, da trotz gleicher Bakterienkonzentration keine genau identische Applikation erreicht werden konnte. Andererseits hat die Temperatur einen grossen Einfluss auf das Wachstum und die Verbreitung von *Xanthomonas* (Imaizumi *et al.* 1999). Daher haben, neben dem unterschiedlichen Entwicklungsstadium der Pflanzen und der unterschiedlichen Schnitttiefe, sicher auch die unterschiedlichen Temperaturverhältnisse im Feld und im Gewächshaus den Verlauf der Infektion beeinflusst. Beide Experimente waren jedoch deutlich positiv korreliert ( $r = 0,67$ ;  $P < 0,01$ ) und zeichneten sich durch hohe Schätzwerte für die Erbllichkeit von 0,84 im Gewächshaus und 0,77 im Feld aus (Studer *et al.* 2006).

### Genomregion mit grossem Effekt

Um Genomregionen zu identifizieren, welche an der Kontrolle der Resistenz gegen Bakterienwelke beteiligt sind, wurden die phänotypischen Erhebungen mit der genetischen Karte in einer QTL-Analyse verrechnet (Patterson *et al.* 1988). Mit dieser Methode lassen sich so genannte «Quantitative Trait Loci» oder QTL identifizieren und lokalisieren, welche einen Einfluss auf die Ausprägung von quantitativen phänotypischen Merkmalen haben. Die Verrechnung der phänotypischen Daten mit der genetischen Karte wurde für den Gewächshaus- und den Feldversuch getrennt durchgeführt. Für die Gewächshaus-



Abb. 5. Künstliche Bakterienwelke-Infektion im Feld. Der Mähbalken wird während dem Mähen mit einer Bakteriensuspension besprüht. (Foto: Madlaina Peter, Agroscope Reckenholz-Tänikon ART)

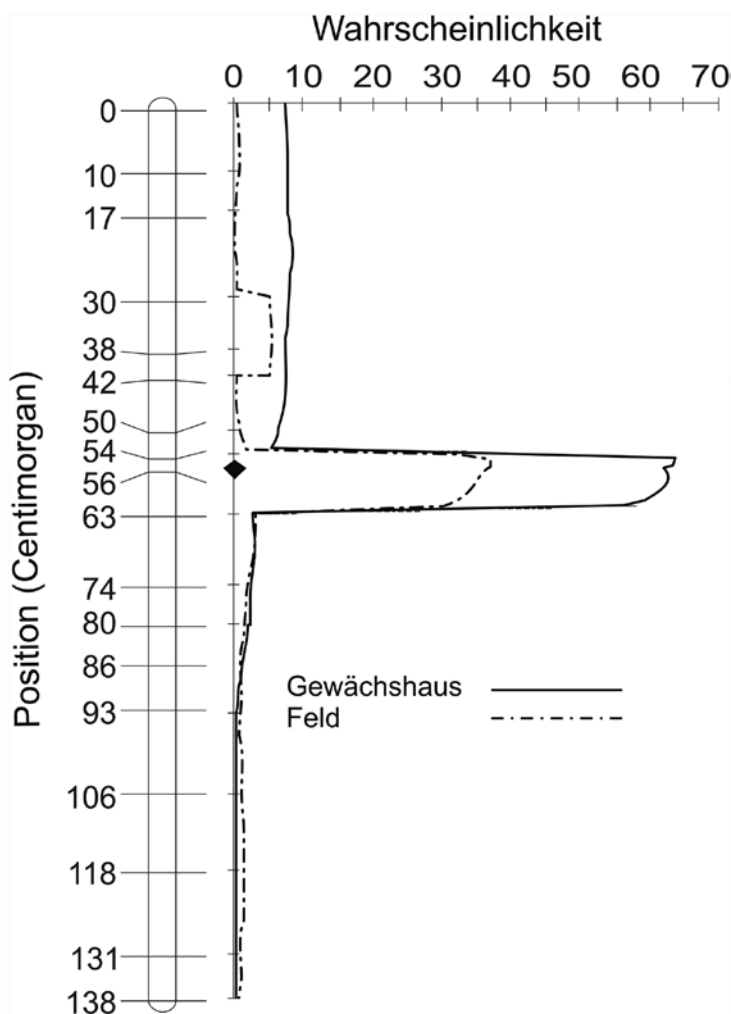
daten wurde auf der Kopplungsgruppe (KG) 4 ein QTL errechnet, welcher nahezu 70 % Prozent der Resistenz gegen Bakterienwelke erklärte (Abb. 7, Tab. 1). Dieser QTL bestätigte sich im Feldversuch, in welchem auf der KG 4 an fast identischer Stelle ebenfalls ein QTL zu finden war, wel-

cher über 40 % der Resistenz erklärte. Die Tatsache, dass dieser QTL in beiden Umwelten detektiert wurde und jeweils einen sehr grossen Anteil der Resistenz erklärte, ist ein starker Hinweis für die Bedeutung dieser Genomregion für die Resistenz gegen Bakterienwelke in Italienisch Raigras.



Abb. 6. Symptome von Bakterienwelke im Feldversuch (Foto: Bruno Studer, Agroscope Reckenholz-Tänikon ART)

Abb. 7. Wahrscheinlichkeit der Position der Genomregion für Resistenz gegen Bakterienwelke, welche auf Kopplungsgruppe 4 (KG 4) detektiert wurde. Die Berechnungen basieren auf Resistenzeigenschaften, welche an 306 Pflanzen im Feld und im Gewächshaus erhoben wurden, und auf molekulargenetischen Markeranalysen.



### Grundlage für Züchtung unterstützt mit Markern

Neben dem wichtigsten QTL auf KG 4 haben wir im Gewächshaus einen zusätzlichen QTL auf KG 5 und im Feld drei weitere QTL auf KG 2, 4 und 6 gefunden, die jeweils zwischen 3 und 11 % der Resistenz erklärten (Tab. 1). Obwohl diese QTL individuell nur einen geringen Teil der Resistenz erklären, könnten sie für die Züchtung dennoch interessant sein. Während QTL mit grossem Effekt wie jener auf KG 4 durch phänotypische Selektion mit grosser Wahrscheinlichkeit erfasst werden, sind QTL mit kleineren Effekten durch solche QTL oft maskiert. Molekulare Marker können die Identifikation solcher QTL erleichtern und erlauben damit die Resistenz zukünftiger Sorten zusätzlich zu verbessern.

Die Charakterisierung der Erregerpopulationen, die Etablierung einer Kartierungspopulation, die Berechnung einer stabilen genetischen Karte und die Identifizierung von mehreren QTL und benachbarten molekulargenetischen Markern schaffen eine solide Grundlage für die mit Markern unterstützte Züchtung von Bakterienwelke-Resistenz in Italienisch Raigras. Die Wirkung der identifizierten QTL muss nun in anderen Populationen bestätigt werden und Marker, die mit diesen QTL gekoppelt sind, müssen für die Routineanwendung optimiert werden.

In Reis befindet sich eines der wichtigsten Resistenzgene gegen *Xanthomonas* (*Xa21*) auf KG 11 (Narayanan *et al.* 2004). Vergleiche mit den verschiedenen Gräsergenomen haben gezeigt, dass diese Reis-KG der KG 4 von Raigras entspricht (Devos 2005). Da-

her stellt der QTL auf KG 4 eine Region dar, die dem Resistenzgen *Xa21* entsprechen könnte. Dies ist insofern interessant, als *Xa21* ein universelles Resistenzgen darstellt, das Resistenz gegen alle bekannten Rassen von *X. oryzae* vermittelt.

Tab. 1. Genomregionen welche für die Resistenz gegen Bakterienwelke wichtig sind, basierend auf QTL-Analyse der Resistenzeigenschaften von 306 Pflanzen im Feld und im Gewächshaus

Umwelt	Kopplungsgruppe	Position in Centimorgan (95 % Vertrauensintervall)	Erklärter Anteil der Resistenz (%)
Gewächshaus	4	52 (51-54)	66,8
	5	32 (24-39)	7,4
Feld	1	27 (22-38)	2,9
	4	36 (29-41)	10,8
	4	56 (54-58)	43,3
	6	68 (49-73)	7,3

## Literatur

■ Boller B. & Lehmann J., 1996. Impact of selection for *Xanthomonas* resistance on yielding ability of Italian ryegrass in Switzerland. In: The 2nd International Conference on Harmful and Beneficial Microorganisms in Grassland, Pastures and Turf. Herausgegeben von K. Krohn und V. H. Paul. *IOBC/ wprs Bulletin*, **19** (7), S. 147-154.

■ Devos K.M., 2005. Updating the «Crop circle». *Current Opinion In Plant Biology* **8** (2), 155-162.

■ Egli T., Goto M. & Schmidt D., 1975. Bacterial wilt, a new forage grass disease. *Phytopathologische Zeitschrift* **82**, 111-121.

■ Imaizumi S., Honda M. & Fujimori T., 1999. Effect of temperature on the control of annual bluegrass (*Poa annua* L.) With *Xanthomonas campestris* pv. *poae* (Jt-P482). *Biological Control* **16** (1), 13-17.

■ Kölliker R., Kraehenbuehl R., Boller B. & Widmer F., 2006. Genetic diversity and pathogenicity of the grass pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 109-119.

■ Narayanan N.N., Baisakh N., Oli-va N.P., VeraCruz C.M., Gnanamanickam S.S., Datta K. & Datta S.K., 2004. Molecular breeding: marker-assisted selection combined with bi-olistic transformation for blast and bacterial blight resistance in Indica rice (cv. CO39). *Molecular Breeding* **14** (1), 61-71.

■ Paterson A.H., Lander E.S., Hewitt J.D., Peterson S., Lincoln S.E. & Tanksley S.D., 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* **335**, 721-726.

■ Rechsteiner M.P., Widmer F. & Kölliker R., 2006. Expression pro-

filing of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) during infection with the bacterial wilt inducing pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. *Plant Breeding* **125** (1), 43-51.

■ Schmidt D., 1988. Le flétrissement bactérien des graminées fourragères: essais pour limiter la dispersion de la maladie lors du fauchage. *Revue Suisse d'agriculture* **20** (6), 351-357.

■ Studer B., Boller B., Herrmann D., Bauer E., Posselt U.K., Widmer F. & Kölliker R., 2006. Genetic mapping reveals a single major QTL for bacterial wilt resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Theoretical and Applied Genetics* **113** (4), 661-671.

## RÉSUMÉ

### Avec la génétique moléculaire contre le flétrissement bactérien

Les bactéries *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (*Xtg*) causent le flétrissement bactérien, une des maladies les plus importantes du raigras italien (*Lolium multiflorum* Lam.). Grâce à une sélection ciblée, des variétés ont pu être créées qui présentent une résistance appréciable face au flétrissement bactérien. Néanmoins les mécanismes de cette résistance sont en grande partie inconnus et l'amélioration de la résistance évolue lentement. Ce travail décrit la caractérisation de populations pathogènes et l'exploitation des bases de la résistance par des méthodes moléculaires. La caractérisation de 30 isolats de *Xtg* démontre une diversité génétique plutôt faible comparée à celle d'autres pathogènes. De même la virulence des isolats analysés variait faiblement alors qu'on a pu constater des différences significatives au niveau de la sensibilité des trois variétés de *L. multiflorum* testées. Sur la base d'une carte génétique et d'infections artificielles en champs et sous serre une région génétique a pu être identifiée qui expliquait 70 % de la résistance dans la population cartographiée. En outre, des régions génétiques supplémentaires sont apparues; elles sont liées au contrôle de la résistance mais n'expliquent qu'une petite partie de la variation. Ces régions génétiques identifiées forment la première base pour la sélection assistée par marqueurs génétiques pour la résistance contre le flétrissement bactérien.

## SUMMARY

### Molecular genetics for improving bacterial wilt resistance in ryegrass

Bacterial wilt caused by *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (*Xtg*) is a major disease of Italian ryegrass (*L. multiflorum* Lam.). Although targeted resistance breeding has resulted in cultivars with considerable levels of resistance, the mechanisms of inheritance of resistance are poorly understood and further breeding progress is difficult to obtain. In this study, molecular genetic diagnostic tools were used to characterize pathogen populations and to investigate the genetic control of resistance. Molecular genetic characterization of 30 *Xtg* isolates revealed only moderate genetic diversity when compared to other pathogens. In addition, there was only moderate variation in virulence among the isolates while distinct differences in susceptibility among three *L. multiflorum* cultivars were observed. QTL analysis based on a high density linkage map and artificial inoculation in the field and in the glasshouse revealed one major QTL which explained up to 70 % of the resistance. In addition, several additional QTLs were identified which explained a smaller proportion of the resistance observed. The genomic regions identified in this study form a first basis for marker assisted improvement of bacterial wilt resistance in *L. multiflorum*.

**Key words:** Bacterial wilt, disease resistance, genetic diversity, quantitative trait loci (QTL), virulence