

Die Resistenz transgener Weizenlinien gegen Pilzkrankheiten im Feldversuch

Fabio Mascher¹, Caterina Matasci^{1,2}, Yvan Kneubuehler¹, Stefan Kellenberger¹, Carolina Diaz Quijano³, Beat Keller⁴, Christof Sautter³ und Arnold Schori¹.

¹Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 1260 Nyon 1

²Delley Samen und Pflanzen DSP, 1567 Delley

³Eidgenössische Technische Hochschule ETH Zürich, Professur Pflanzenbiotechnologie, 8093 Zürich

⁴Universität Zürich, Institut für Pflanzenbiologie, 8008 Zürich

Auskünfte: Fabio Mascher, E-Mail: fabio.mascher@acw.admin.ch, Tel. +41 22 363 47 33



Aussaat der Resistenztests in Pully.

Einleitung

Im Laufe der Evolution haben die Pflanzen verschiedene Strategien entwickelt, um sich gegen Krankheitserreger zu schützen. Auf der einen Seite verfügen sie über eine Palette von physischen und biochemischen Barrieren, die das Einnisten eines Krankheitserregers verhindern oder verlangsamen. Diese Barrieren wirken unspezifisch, bieten jedoch nur einen unvollständigen Schutz vor Infektionen (Hückelhoven 2007). Andererseits besitzen die Pflanzen spezifische Resistenzen. Diese erlauben der Pflanze bestimmte Rassen eines Krankheitserregers zu erkennen, um so schnell wie möglich eine Reihe biochemischer Abwehrmechanismen zu aktivieren (Slusarenko *et al.* 2000; Niu und He 2009). Solche, durch die Infektion induzierte Abwehrmechanismen werden bei jeder Infektion gebildet. Es ist die Reaktionsgeschwindigkeit, die eine erfolgreiche und vollständige Abwehr ausmachen. Bei dieser induzierten Abwehrreaktion bildet die Pflanze

unter anderem sogenannte PR-Proteine (Englisch für *pathogenesis-related proteins*) (van Loon *et al.* 2006), wie zum Beispiel Glukanasen und Chitinasen. Diese Enzyme können Glukan und Chitin, wichtige Bestandteile der Pilzzellwand, abbauen (Kasprzewska 2003; Liu *et al.* 2009). Glukanasen und Chitinasen schwächen somit eindringende Pilze und hemmen den Infektionsprozess (Liu *et al.* 2009; Ferreira *et al.* 2007).

Die Forschung hat in den letzten Jahrzehnten grosse Kenntnisse über die Funktion der Gene erhalten, die in den oben beschriebenen Abwehrprozess der Pflanze involviert sind. Mehrere Resistenzgene wurden geklont (isoliert) und können nun mittels Transgenese auf Pflanzen übertragen werden, die diese Gene nicht besitzen. Die Einfügung solcher Resistenzgene in eine neue Pflanze erlaubt es unter anderem deren Funktion zu überprüfen und besser zu verstehen, sowie das Zusammenspiel mit anderen Genen zu untersuchen. Die erhaltenen Erkenntnisse sind sehr wertvoll für die klassische Züchtung moderner Kulturpflanzensorten und können auch zur Entwicklung transgener Sorten verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die Resistenz gegen verschiedene pilzliche Krankheitserreger in transgenem und nicht-transgenem Weizen untersucht. Es soll dazu die Wirkung der zwei Resistenztypen nämlich allgemeine, unspezifische Resistenz und qualitative, rassenspezifische Resistenz geprüft werden. Quantitative Resistenz wurde mit zusätzlichen Chitinase- und Glukanasegenen aus der Gerste auf die Sommerweizensorte Frisal übertragen (Bieri *et al.* 2003). Für den rassenspezifischen Resistenzansatz wurde das Pm3b Resistenzgen gegen den Echten Mehltau in die Sorte Bobwhite übertragen (Brunner *et al.* 2011). Vier unabhängige transgene Bobwhite-Pm3b Linien und deren nicht-transgene Schwesterlinien werden untersucht (Foetzki *et al.* 2012). Anhand dieser Linien ist es möglich die Auswirkungen des Transformationsprozesses auf die Pflanze zu studieren (Sharp *et al.* 2002). Sowohl die Chitinase / Glukanase

Linien als auch die Pm3b Linien haben eine deutliche Verbesserung der Resistenz im Gewächshaus gegen den Echten Mehltau gezeigt (Bieri *et al.* 2003; Brunner *et al.* 2011). Die transgenen Pm3 Linien haben zudem in Freilandversuchen eine stark verbesserte Resistenz gegen den Echten Mehltau aufgewiesen (Foetzki *et al.* 2011; Brunner *et al.* 2011). In dieser Arbeit wird die Wirkung der verschiedenen transgenen Resistenzen auf den echten Mehltau sowie auf den Gelbrost und die Ährenfusariose unter hohem Infektionsdruck in Resistenztests mit künstlichen Infektionen näher untersucht.

Material und Methoden

Untersuchte Weizensorten und -linien

Sämtliche in diesem Versuch verwendeten Weizensorten und -linien werden in Tabelle 1 beschrieben. Als Kontrollen dienten die Ursprungsorten Bobwhite und Frisal sowie die modernen Sommerweizensorten Toronit, Fiorina, Casana und Rubli. Der Infektionsdruck in den Resistenztests wurde mit Hilfe jeweils einer anfälligen und einer resistenten Sorte überwacht.

Aufbau der Feldversuche

Die Feldversuche wurden auf Parzelle 51 auf dem Gelände von Agroscope Changins-Wädenswil Forschungszentrum Pully, in den Jahren 2009 und 2010 durchgeführt. Die Versuche wurden für jede Krankheit separat angelegt. Zwei Reihen der Triticalesorte Trado trennten die Resistenzversuche voneinander. Die Weizensorten wurden in Horsten mit 40 Körnern pro Weizensorte oder -linie und in einem Abstand von etwa 30 × 30 cm zwischen den Horsten angesät. Die Wiederholung innerhalb der Resistenzversuche wurden mit einer Reihe einer für die jeweilige Krankheit anfälligen Sorte getrennt (Infektionslinie; Tab. 1). Es wurden keine Fungizide eingesetzt. Bei Überschreiten der Schadschwelle der Fritfliege (*Cecidomyia destructor*), (1 Ei/m²) wurde dreimal im Abstand von einer Woche mit Karate Zeon (Lambda-Cyhalothrin 9,43 %; Syngenta Agro, AG, Dielsdorf, Schweiz; 75 l in 300 l Wasser/ha) behandelt.

Künstliche Infektionen

Die künstlichen Infektionen werden in Michel (2001) beschrieben. Sämtliche verwendeten Pathogenisolate stammen aus der Schweiz und spiegeln weitgehend die Virulenzen in den hiesigen Populationen wider (Mascher *et al.* 2010; Mascher *et al.* 2012). Pflanzen der anfälligen Sorten Kanzler und Oi2- wurden im Gewächshaus gezogen und mit Echem Mehltau infiziert. Nach zwei Wochen wurden die stark befallenen Pflanzen in die Infektionslinien im Resistenztest gepflanzt.

Zusammenfassung Die Übertragung von zusätzlichen Resistenzgenen zwischen Pflanzen mit Hilfe der Transgenese erlaubt ein besseres Verständnis der Funktion dieser Gene und deren Zusammenspiel mit anderen Genen der Pflanze. In der vorliegenden Arbeit wird die Resistenz von verschiedenen transgenen Weizenlinien gegen die Krankheiten Echter Mehltau, Gelbrost und Ährenfusariose untersucht. Auf der einen Seite wurde das rassenspezifische Mehltaresistenzgen *Pm3b* aus der Weizenlandrasse Chul auf die Sorte Bobwhite übertragen. Der zweite Ansatz untersuchte eine verbesserte quantitative, unspezifische Resistenz durch die Gene Chitinase und Glukanase aus der Gerste in der Weizensorte Frisal. Die Versuche wurden mit hohem Infektionsdruck geführt um die Resistenz zwischen transgenen Linien und Ursprungsorte vergleichen zu können. Im Falle der *Pm3b*-Bobwhiteabkömmlinge konnte auch auf nicht-transgene Schwesterlinien zurückgegriffen werden. Die Schwesterlinien haben den gleichen Transformationsprozess durchschritten, jedoch ging das Transgen nach der Regeneration der Pflanzen bei der Segregation verloren. Die Ergebnisse zeigen, dass das zusätzliche *Pm3b*-Gen die Resistenz gegenüber Infektionen durch den Echten Mehltau auf dem Blatt und auf der Ähre deutlich verbessert. Überraschenderweise entwickelt eine der transgenen Bobwhitelinien ebenfalls eine verbesserte Resistenz gegen den Gelbrost. Die Resistenz gegen die Ährenfusariose wird hingegen kaum beeinflusst. Die zusätzlichen Chitinase und Glukanase Gene in der Sorte Frisal haben keinen Einfluss auf das Resistenzverhalten der transgene Pflanzen gezeigt. Die Erkenntnisse aus diesem Versuch sind unter anderem sehr wertvoll für die klassische Züchtung resistenter Sorten.

Gelbrostisolate wurden auf den anfälligen Sorten Coker und Eridano (Tab. 1) im Gewächshaus gezogen. Stark sporenproduzierende Pflanzen wurden in die Infektionslinie des Resistenztests gepflanzt. Zudem wurden die Sporen in Petroleum suspendiert und die Sporensuspension auf die Infektionslinien gesprüht.

Das Inokulum für die Resistenztests für die Ährenfusariose bestand aus einer Mischung mehrerer *Fusarium culmorum* Stämme. Die Sporen wurden auf Weizenkörnern produziert und mit 10⁶ Sporen pro ml bei Anfang der Blüte auf die Prüflinge gesprüht (Häller Gärtner *et al.* 2008).

Tab. 1 | Beschreibung der verwendeten Weizensorten und -linien

Name	Liste der Weizensorten und -linien	
	Beschreibung	Herkunft / Züchter
Pm3b-1tg	transgene Linie mit <i>Pm3b</i> -Gen	Universität Zürich, B. Keller
Pm3b-1sl	Schwesterlinie von Pm1tg, nicht transgen	Universität Zürich, B. Keller
Pm3b-2tg	transgene Linie mit <i>Pm3b</i> -Gen	Universität Zürich, B. Keller
Pm3b-2sl	Schwesterlinie von Pm ² tg, nicht transgen	Universität Zürich, B. Keller
Pm3b-3tg	transgene Linie mit <i>Pm3b</i> -Gen	Universität Zürich, B. Keller
Pm3b-3sl	Schwesterlinie von Pm3tg, nicht transgen	Universität Zürich, B. Keller
Pm3b-4tg	transgene Linie mit <i>Pm3b</i> -Gen	Universität Zürich, B. Keller
Pm3b-4sl	Schwesterlinie von Pm4tg, nicht transgen	Universität Zürich, B. Keller
Bobwhite	Ursprungssorte für die <i>Pm3b</i> Transformationen	CIMMYT, Mexiko
A9	transgene Linie mit Chitinase und Glukanase Genen	ETH Zürich, C. Sautter, W. Gruissem
A13	transgene Linie mit Chitinase und Glukanase Genen	ETH Zürich, C. Sautter, W. Gruissem
Frisal	Ursprungssorte für die Chi-Glu Transformationen	Agroscope/DSP
Toronit	Handelssorte, zum Vergleich	Agroscope/DSP
Fiorina	Handelssorte, zum Vergleich	Agroscope/DSP
Casana	Handelssorte, zum Vergleich	Agroscope/DSP
Rubli	Handelssorte, zum Vergleich	Agroscope/DSP
Oi-	Experimentelle Linie, Vergleich für echten Mehltau	Agroscope
OiS	Experimentelle Linie, Vergleich für echten Mehltau	Agroscope
Eridano	Handelssorte, Vergleich für Gelbrost	SPS Bologna, Italien
Aletsch	Handelssorte, Vergleich für Gelbrost	Agroscope/DSP
Nadro	Handelssorte, Vergleich für Ährenfusariose	Agroscope/DSP
Sonalika	Handelssorte, Vergleich für Ährenfusariose	CIMMYT, Mexiko

Bonituren

Die Infektionsstärke wurde als Anteil der befallener Blattfläche mit Hilfe einer logarithmischen 1–9 Skala bonitiert (Tab. 2). Die Stärke der Mehltauinfektion auf der Ähre wurde auf 20 einzeln bonitierten Ähren mit Hilfe der 1–9 Skala beurteilt. Für die Infektionshäufigkeit (Inzidenz) von Gelbrost wurden die Präsenz von Symptomen auf den Blättern von 20 Trieben erhoben. Die Inzidenz der Ährenfusariose wurde auf 25–30 Trieben erhoben. Je nach Dauer der Infektion wurden von jeder Krankheit im Laufe der Saison wenigstens zwei, durchschnittlich jedoch fünf Noten, gesammelt. Die Konzentration des Mykotoxins DON wurde mit dem Kit Ridascreen FAST DON (r-biopharm, Darmstadt, Allemagne) gemäss dem Protokoll des Herstellers ermittelt.

Aufbau und statistische Auswertungen

Die Versuche wurden als vollständig zufällig angeordnete Blocks (complete randomized blocks), mit jeweils vier Wiederholungen je Krankheit und über zwei Jahre durchgeführt. Jeder Block ist eine Wiederholung und enthält sämtliche 18 Sorten.

Die Noten der Infektionsstärke und die Infektionsinzidenz wurden über die Beobachtungsdauer integriert und als Fläche unter der Befallsverlaufskurve (AUDPC, Englisch für «area under the disease progress curve») ausgedrückt. Diese Kennzahl wurde mit der Formel $AUDPC = \sum [(x_i + x_{i+1})/2] \cdot t_i - \sum t_i$ berechnet. Um die Infektionserhebungen zwischen den Jahren vergleichen zu können wird die AUDPC durch die Anzahl der Tage zwischen der ersten und der letzten Bonitur geteilt (AUDPC rel.).

Die gesammelten Daten wurden mit dem Programm SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc, Chicago, USA) analysiert. Nach Test der Normalverteilung der Residuen wurde eine monofaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Sorten wurden mit Hilfe des Tukey HSD Tests ermittelt ($P < 0,02$).

Tab. 2 | Boniturskala für Blatt- und Ährenbefall

Note	Befallene Fläche
1	0
2	2.5%
3	12.5%
4	25%
5	50%
6	75%
7	87.5%
8	97.5%
9	100%

Resultate

Im Resistenztest für Echten Mehltau mit künstlicher Infektion zeigten alle vier transgenen *Pm3b* Linien deutlich erhöhte Resistenz gegenüber der Ursprungssorte Bobwhite (Abb. 1). Die nicht-transgenen Schwesterlinien weisen einen deutlich höheren, statistisch gesicherten, Befall auf als die Linien mit dem Gen *Pm3b*. Dies verdeutlicht, dass zusätzliche *Pm3b* Gene die Resistenz erhöhen. Einige der verwendeten Mehltäustämme enthielten die *Pm3b*-Virulenz, die es dem Erreger erlaubt die Resistenz *Pm3b* zu umgehen (Daten nicht gezeigt; Virulenzliste in Matasci *et al.*, in Vorbereitung). Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass das zusätzliche, transgene *Pm3b*-

Gen in den Bobwhitelinen auch gegen Erreger schützen kann, die Pflanzen mit der nicht-transgenen *Pm3b* Resistenz infizieren können. Im Jahr 2010 waren die Infektionsbedingungen und der Befallsdruck besonders hoch, was dazu führte, dass der Mehltau ebenfalls die Ähren der Sorte Bobwhite und einige ihrer Abkömmlinge befallen konnte. Der Ährenbefall war sehr stark auf Bobwhite und auf den vier nicht transgenen Schwesterlinien (Abb. 2). Die transgenen Linien Pm3b-1tg, Pm3b-2tg und Pm3b-4tg wiesen einen deutlich geringeren, statistisch abgesicherten Befall auf. Der Befall auf der transgenen Linie Pm3b-3tg zeigte sehr grosse Schwankungen und war statistisch vergleichbar mit dem Befall sowohl auf Bobwhite als auch auf Pm3b-2tg.

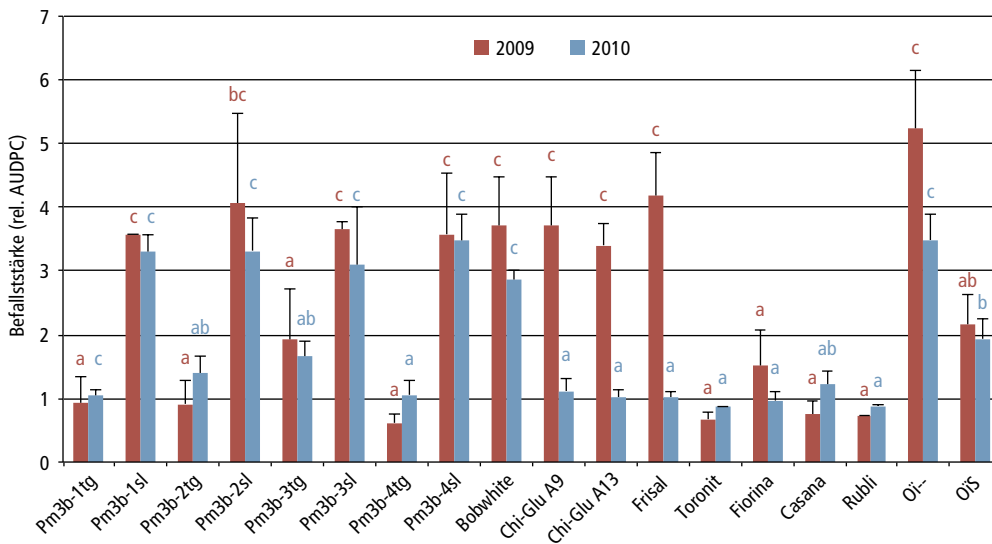


Abb. 1 | Befallsstärke des echten Mehltaus in den Jahren 2009 (rote Balken) und 2010 (blaue Balken). Die statistische Auswertung (ANOVA) wurde für jedes Jahr getrennt durchgeführt. Gleiche Buchstaben zeigen statistisch vergleichbare Befallsstärken im jeweiligen Jahr an (Tukey HSD, $P < 0,02$).

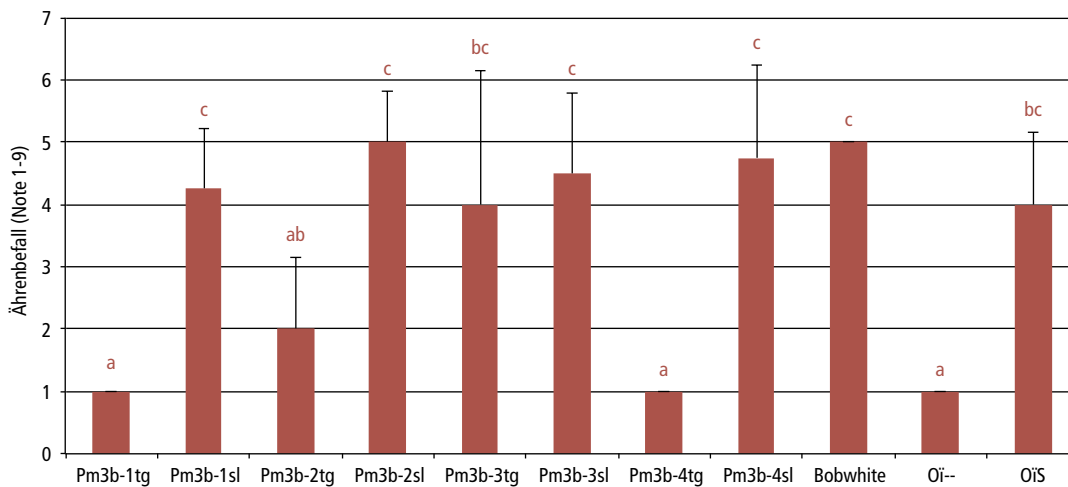


Abb. 2 | Ähreninfektion durch den echten Mehltau auf Bobwhite und den transgenen und nicht-transgenen Abkömmlingen. Die Buchstaben über den Balken zeigen die statistischen signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen an (Tukey HSD, $P < 0,02$).

Frisal und die transgenen Abkömmlinge A9 und A13 wiesen im Jahr 2009 einen starken Mehlnaubbefall und im Jahr 2010 keinen Befall auf (Abb. 1). Der starke Befall im Jahr 2009 ist vermutlich auf die Gegenwart von virulenten Mehlnaustämmen zurückzuführen. Die zusätzlichen Gene für Chitinase und Glukanase zeigten jedoch auch unter diesen Bedingungen keine Wirkung. Frisal und die transgenen Abkömmlinge zeigten keinerlei Ähreninfektionen.

Abbildung 3 zeigt die Stärke der Infektionen durch Gelbrost in den beiden Versuchsjahren 2009 und 2010. Frisal und die transgenen Frisal Abkömmlinge zeigen in beiden Jahren nur ein sehr geringes Infektionsniveau. Bobwhite wurden in beiden Jahren befallen. Die Infektionsstärke wies keinen statistisch signifikanten Unterschied zu den transgenen Linien oder den nicht-transgenen Schwesterlinien auf mit Ausnahme der Linien

Pm3b-2tg. Die transgene Linie Pm3b-2tg zeigte in beiden Jahren das geringste Infektionsniveau zwischen den Bobwhitelinien. Der Unterschied ist jedoch nur im Jahr 2010 statistisch abgesichert. Um die Unterschiede zwischen den Bobwhitelinien besser zu verstehen, wurde im Jahr 2010 die Befallshäufigkeit, d.h. die Anzahl der Triebe mit Gelbrostsymptomen, ermittelt. Die Ergebnisse zeigen auch hier einen deutliche höhere Resistenz der Linie Pm3b-2tg im Vergleich zu Bobwhite und den anderen Bobwhitelinien (Abb. 4).

Die Häufigkeit der Fusariuminfektionen im Jahr 2009 sind in Abbildung 5* dargestellt. Die Infektionen sind zwischen sämtlichen Sorten statistisch nicht signifikant, mit Ausnahme der Infektionsstandards Nadro

*Abbildung 5 ist unter http://tiny.cc/2012RAS_supplement verfügbar.

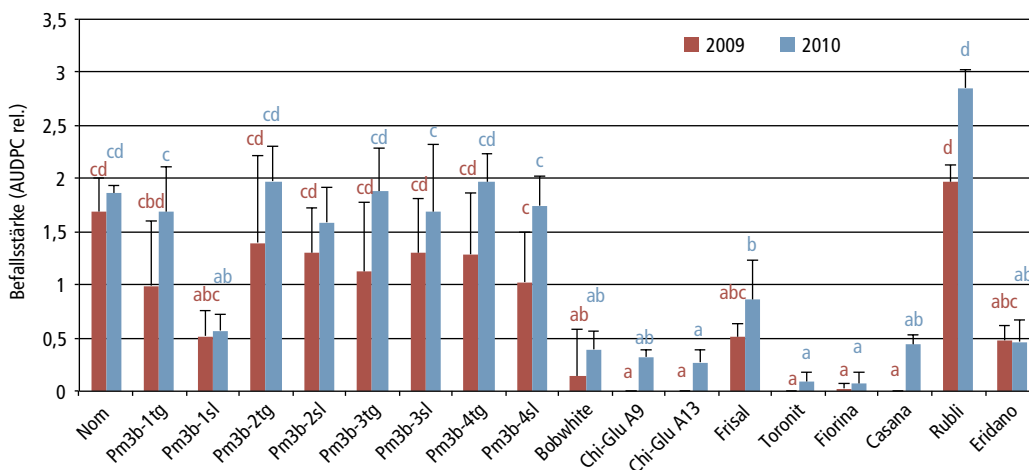


Abb. 3 | Befallsstärke des Gelbrosts im Resistenztest in den Jahren 2009 und 2010. Gleiche Buchstaben über den Balken zeigen statistisch vergleichbare Befallsstärken an (Tukey HSD, P<0,02).

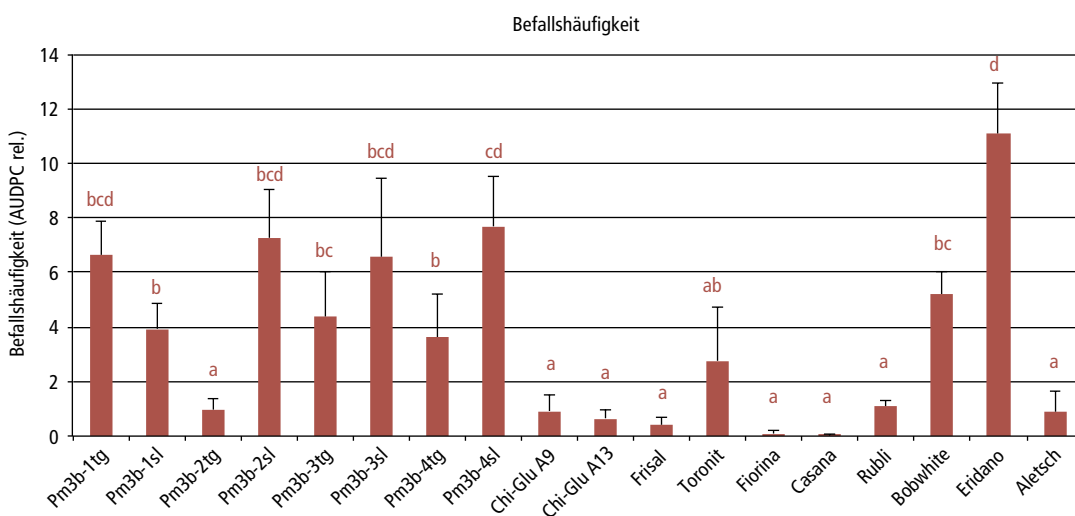


Abb. 4 | Befallshäufigkeit des Gelbrosts auf den Trieben. Gleiche Buchstaben über den Balken zeigen statistisch vergleichbare Befallsstärken an (Tukey HSD, P<0,02).

Tab. 3 | Kornqualität nach künstlicher Infektion mit *Fusarium* auf der Ähre. Statistischer Vergleich (Varianzanalyse) transgener und nicht-transgener Linien der Weizensorten Bobwhite und Frisal. Linien und Sorten mit einem Resistenzniveau über dem Durchschnitt werden erwähnt.

	Bobwhite		Frisal	
	2009	2010	2009	2010
Mycotoxingehalt (DON)	p=0,006	p=0,476 ns	p=0,004	p=0,003
	Pm3b-1tg, Pm3b-4tg	-/-	Frisal	Frisal
Anteil Schrumpelkörner	p=0,029	p=0,021	p=0,227	p=0,166
	-/-	Pm3b-1sl, Pm3b-4tg	-/-	-/-
Tausendkorngewicht	p=0,004	p=0,172	p=0,068	p=0,019
	Pm3b-2sl, Pm3b-4sl	-/-	-/-	A9

(sehr resistent) und Sonalika (sehr anfällig). Die transgenen Linien Pm3b-1tg und Pm3b-2tg wiesen geringfügig häufiger Infektionen auf als ihre jeweiligen Schwesterlinie Pm3b-1sl und Pm3b-2sl. Diese Unterschiede waren zwar statistisch nicht signifikant, konnte jedoch auch in den Versuchen im Jahr 2010 in der Kombination Pm3b-1tg – Pm3b-1sl beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine Infektion durch *Fusarium* kann auch die Kornqualität beeinträchtigen. Bei den geernteten Körnern wurden daher der Anteil an Schrumpfkörnern, das Tausendkorngewicht und die Verunreinigung durch das *Fusarium*mykotoxin Deoxynivalenol untersucht. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten zeigt, dass es signifikante Unterschiede zwischen den Linien innerhalb der Bobwhite und der Frisal- Gruppen gibt (Tab. 3). Im Falle der DON Konzentrationen in der Frisal-Gruppe, reichern die Körner der Ursprungssorte deutlich weniger Mykotoxin an als die transgenen Abkömmlinge. Innerhalb der Bobwhite Gruppe konnten Unterschiede nur im Jahr 2009 festgestellt werden. Die transgenen Linien Pm3b-1tg und Pm3b-4tg haben im Jahr 2009 weniger Mykotoxine aufgewiesen als alle anderen Linien der Gruppe.

Diskussion

In dieser Arbeit soll die Wirkung zusätzlicher Gene zur Verbesserung der Resistenz in Weizen an Hand der zwei Beispiele *Pm3b* Gen in Bobwhite und Chitinase /Glukanase Gene aus der Gerste in Frisal untersucht werden. Die transgenen Linien werden jeweils mit der Ursprungssorte verglichen. Im Falle der *Pm3b* Linien stehen ausserdem die Schwesterlinien zur Verfügung, welche nach dem Transformationsprozess das Transgen durch genetische Segregation verloren haben. Schwesterlinien und transgene Linien stammen somit vom gleichen transformierten Bobwhite-Embryo ab, haben den gleichen Transformationsprozess durchlaufen. Die Schwesterlinie haben jedoch das Transgen verloren. Mit Hilfe der

Schwesterlinien ist es daher möglich, eventuelle somaklonale Veränderungen oder Mutationen zu erkennen die auf den Transformationsprozess zurückzuführen sind und diese von den direkten Auswirkungen des Transgens zu trennen.

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Einführung des *Pm3b* Gen in eine anfällige Sorte die Resistenz gegen den echten Mehltau im Freiland erhöht während die Schwesterlinien das gleiche Resistenzniveau aufweisen wie die Ursprungssorte Bobwhite. Dies wurde bereits von verschiedenen Autoren in unabhängigen Versuchen beschrieben und kann hier in einer neuen Umwelt bestätigt werden (Brunner *et al.* 2011; Foetzki *et al.* 2011; Alvarez-Alfageme *et al.* 2011). Das Auftreten der Ähreninfektion erlaubt weitergehende Einblicke in das Resistenzverhalten der transgenen Pflanzen. Ähreninfektionen treten auf bei besonders günstigen Infektionsbedingungen und auf anfälligen Sorten (Cunfer 2002) und verursachen vermutlich hohe Ertragsausfälle (Mascher *et al.* 2006). Bobwhite ist offensichtlich sehr anfällig. Die Präsenz des *Pm3b* Gens verhindert oder verzögert die Infektion. Die Linie Pm3b-3tg reagiert sehr uneinheitlich und zeigt eine grosse Standardabweichung (Abb. 2). Die Linie Pm3b-3tg exprimiert das Transgen sehr ungleichmässig von einem Individuum zum anderen. Brunner *et al.* (2011) beobachtet bei der Linie Pm3b-3tg dass die Aktivität des Transgens herunterreguliert ist («gene silencing»). Die hier beschriebenen Schwankungen der Resistenz könnten ebenfalls auf eine reduzierte Aktivität des Gens zurückgeführt werden. Die Grundlage der Resistenz gegen Ähreninfektionen ist noch nicht geklärt. Tatsächlich schützen monogenische Resistenzen nicht immer vor Ähreninfektion (Tyryshkin & Gashimov 2009). Die gemeinsame Wirkung von quantitativen und qualitativen Resistenzen spielt vermutlich eine grosse Rolle bei der Vermeidung von Ähreninfektionen. Zusätzliche, funktionierende *Pm3b* Gene verleihen unter den hier getesteten Bedingungen offensichtlich eine ausreichende Resistenz. >

Die transgene Linie Pm3b-2tg zeigt in unseren Versuchen eine deutlich verbesserte Resistenz gegen den Gelbrost. Diese Resistenz limitiert nicht nur die Stärke und Ausbreitung der Infektion auf den Blättern, sondern verhindert auch die Einnistung des Pathogens auf dem Blatt. Brunner *et al.* (2011) berichten, dass die transgene Linie Pm3b-2tg das *Pm3b*-Gen am stärksten exprimiert. Es ist vorstellbar, dass bei einer sehr starken Expression des Gens ein anderes Pathogen die sekundären Resistenzmechanismen induzieren kann. Diese Hypothese muss allerdings auf den Gelbrost beschränkt werden, denn weder die Ährenfusariose noch andere Pathogene wie z.B. der Braunrost (*P. triticina*) oder Septoria Blatt- und Spelzenbräune (*Phaeosphaeria nodorum*, *Mycosphaerella graminicola*) wurden nennenswert gehemmt (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass das *Pm3b* Gen auch die Resistenz des Gelbrosts günstig beeinflusst, ist ein wichtiger Ausgangspunkt für weitere Studien über den Vergleich und mögliche Wechselwirkungen zwischen pflanzlichen Resistenzen gegenüber verschiedenen Erregertypen,

Die zusätzlichen Chitinase und Glukanase Gene in der Sorte Frisal haben keine signifikante Verbesserung des Resistenzverhaltens gegenüber der Ursprungsorte Frisal gezeigt. Diese Beobachtungen werden durch Daten zur Infektionsstärke durch Echten Mehltau in einem halboffenen Gewächshaus bestätigt (Alvarez-Alfageme *et al.* 2011). Im Gewächshaus waren die transgenen Chitinase und Glukanase Linien signifikant widerstandsfähiger gegen den echten Mehltau als die Ursprungsorte Frisal. Tatsächlich ist die Ausgangsorte Frisal bereits eine resistente Sorte. Bei hohem Befallsdruck durch virulente Stämme, wie dies vermutlich im Jahr 2009 der Fall war, zeigten die zusätzlichen Resistenzgene in Frisal keinen Effekt. Eine Verbesserung der Resistenz gegen den Gelbrost konnte nicht ausgemacht werden, denn die Ursprungsorte Frisal ist auch gegen die verwendeten Gelbrostisolate bereits resistent.

Die Resistenz gegen die Ährenfusariose ist quantitativ und muss sorgfältig mit verschiedenen Parametern gemessen werden. In dieser Studie haben wir sowohl die Infektionsstärke als auch die Infektionshäufigkeit während der Saison erhoben. Nach der Ernte wurden die Formveränderungen des Korns (Schrumpelkörner), Tausendkorngewicht und die Anreicherung des Mykotoxins Deoxynivalenol (DON) in den Körnern erhoben. Zusätzliche Chitinase und Glukanase Gene in Frisal haben kaum einen dieser Infektionsparameter günstig beeinflusst. Sogar im Gegenteil, Körner der Sorte Frisal reichern offensichtlich weniger DON an als die Körner ihrer transgenen Abkömmlinge. In transgenen Bobwhitelinien mit zusätzlichen Chitinase und Glukanase Genen wurde

ebenfalls die Resistenz gegen die Ährenfusariose getestet (Mackintosh *et al.* 2007). In dieser Arbeit wurden die gleichen Infektionsparameter erhoben wie hier. Interessanterweise, wurden verschiedene Resistenztypen und Resistenzkombinationen gefunden.

Die moderne Züchtung basiert grösstenteils auf der klassischen Pedigree-Züchtung (Fossati & Brabant 2003). Die Erkenntnisse aus der Genforschung erhalten zunehmende Wichtigkeit bei der Auswahl guter Elternsorten und bei folgenden Sortenzüchtung (Moulet *et al.* 2008). Die Erkenntnisse aus diesen Versuchen helfen die Funktionsweise von Resistenzgenen zu verstehen und in der Praxis zu verwenden. R-Gene, wie *Pm3b*, werden routinemässig in modernen Weizensorten verwendet. Die Verbesserung der Sorten durch quantitative Resistenzen ist eine der grossen Herausforderungen der Zukunft. Die Kenntnis über die unbeständige Wirkung von zusätzlichen Chitinase und Glukanase Genen im Weizen zeigt, dass die genetische Basis quantitativer Resistenzen komplexer ist als bis anhin angenommen.

Schlussfolgerungen

- Die Einbringung des *Pm3b* Gens erhöht die Resistenz der Sommerweizensorte Bobwhite gegen den Echten Mehltau des Weizens.
- Interessanterweise wirkt dieses zusätzliche Gen auch gegen Ähreninfektionen.
- Die transgene Bobwhite Linie Pm3b-2tg zeigt auch eine deutliche Verbesserung gegen den Gelbrost (*Puccinia striiformis*).
- Zusätzliche Glukanase und Chitinase Gene haben unter den getesteten Bedingungen im Feld keine deutlichen Resistenzverbesserungen gezeigt.
- Resistenzen gegen die Ährenfusariose wurden nicht verändert.
- Diese Arbeiten helfen die Funktion und die Grenzen von Resistenzgenen besser zu verstehen und unterstützen damit die klassische Züchtung resistenter Pflanzen. ■

Riassunto**La resistenza di linee transgeniche di frumento contro malattie crittogamiche in prove in campo**

Il trasferimento di geni di resistenza supplementari attraverso la transgenesi permette di meglio comprendere il funzionamento di questi geni e la loro interazione con altri geni della pianta. Questo studio esamina la resistenza di diverse linee di frumento contro oidio, ruggine gialla e fusariosi della spiga. Esso studia da un lato il gene di resistenza specifica *Pm3b* proveniente dalla varietà locale Chul trasferito alla varietà Bobwhite e, da l'altro, la resistenza quantitativa, non-specifica, apportata dai geni chitinasi e glucanasi provenienti dall'orzo e trasferiti sulla varietà di frumento Frisal. Le prove sono state condotte sotto forte pressione d'infezione in modo da confrontare il livello di resistenza della linea transgenica con la varietà di origine non modificata. Nel caso dei discendenti *Pm3b* di Bobwhite, è stato possibile inoculare le linee sorelle non transgeniche. Queste linee sorelle hanno subito lo stesso processo di trasformazione, ma hanno in seguito, perso il transgene attraverso segregazione dopo rigenerazione con semente della pianta. I risultati mostrano che il gene supplementare *Pm3b* migliora considerevolmente la resistenza verso le infezioni provocate dall'oidio, sia su foglia, sia su spiga. In modo inatteso una linea transgenica mostra anche una migliore resistenza verso la ruggine gialla. Per contro, la resistenza alla fusariosi della spiga non è assolutamente influenzata dalla presenza o dall'assenza del transgene. I geni supplementari chitinasi e glucanasi non hanno mostrato alcuna efficacia sulla resistenza delle piante transgeniche. Le conoscenze acquisite attraverso queste prove sono molto utili per la selezione classica di varietà resistenti.

Literatur

Literatur und zusätzliche Informationen unter http://tiny.cc/2012RAS_supplement.

Summary**The resistance of transgenic wheat lines against fungal infections in field trials**

The transfer of additional resistance genes by transgenesis allows to better understand their function and interactions with the other genes of the plant. This study examines the resistance of different wheat lines against powdery mildew, stripe rust and *Fusarium* head blight. On the one hand, the race specific resistance gene *Pm3b* of the wheat landrace Chul has been transferred to the variety Bobwhite, on the other hand, non specific, quantitative resistance provided by chitinase and glucanase genes has been added to the variety Frisal. The trials have been realized under strong infection pressure in order to compare the resistance level of the transgenic lines with their original varieties. In the case of *Pm3b* descendants, it was possible to include non-transgenic sister lines. The sister lines underwent the same transformation process as the transgenic lines but the transgene was lost after regeneration of the plant by seeds due to segregation. The results show that the additional *Pm3b* improves considerably the resistance against powdery mildew infections on leaves but also on the ears. Surprisingly, one of the transgenic lines displays improved resistance against stripe rust. Resistance against *Fusarium* head blight is not affected by the presence or absence of the transgene. Additionally introduced chitinase and glucanase genes did not improve the resistance improvement under the present experimental conditions. The new insight obtained with the present trials are useful for the classical breeding of resistant varieties.

Key words: powdery mildew, stripe rust, *Fusarium* head blight, somaclonal variations, efficiency, side effects.