

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung

Genetische Charakterisierung der Feldresistenz gegen den  
Echten Mehltau bei Winterweizen

**Christoph J. Bauer**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Agrarwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K. J. Hülsbergen  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel (i.R.)  
2. Univ.-Prof. Dr. R. Hückelhoven

Die Dissertation wurde am 05.07.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 19.10.2011 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	5
1.1	Der Saatweizen.....	5
1.2	Echter Mehltau bei Weizen .....	7
1.3	Resistenz gegen den Weizenmehltau .....	8
1.4	Strategien der Resistenzzüchtung.....	16
1.5	Analyse der Resistenzgenetik.....	17
1.6	Zielsetzung .....	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	24
2.1	Pflanzenmaterial.....	24
2.2	Feldversuche.....	24
2.3	Infektionstests mit Einsporisolen .....	26
2.4	DNA-Extraktion .....	27
2.5	AFLP-Marker Entwicklung.....	28
2.6	Gelelektrophorese.....	31
2.7	Strategien der Markerentwicklung .....	31
2.8	Lokalisierung der Marker.....	32
2.9	Charakterisierung der QTL .....	33
2.10	STS- und Pyrosequencing Marker .....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	37
3.1	Charakterisierung und Phänotypisierung der Feldresistenz gegen den Echten Mehltau im Winterweizensortiment .....	37
3.1.1	Sorten mit unbekanntem Resistenzgenen: Cortez .....	37
3.1.2	Sorten mit unbekanntem Resistenzgenen: Dobros .....	41
3.1.3	Sorten mit unbekanntem Resistenzgenen: Classic .....	44
3.1.4	Resistente Sorten mit bekanntem Resistenzgenen: Dekan .....	47
3.1.5	Resistente Sorten mit bekanntem Resistenzgenen: Convent.....	50
3.1.6	Linien mit unbekanntem Resistenzgenen: K2 .....	52
3.2	Entwicklung von STS und Pyrosequencing-Markern für das Resistenzgen <i>Pm29</i> .....	55
3.2.1	STS- Marker .....	55
3.2.2	Pyrosequencing Marker.....	57

<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	59
4.1	Phänotypische Charakterisierung der Resistenz .....	59
4.2	Genetische Charakterisierung .....	61
4.3	Assoziation der bekannten Gene mit Feldbonituren .....	63
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	70
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	72
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	87
7.1	Ergebnisse der Inokulationsversuche .....	87
7.2	Chemikalienverzeichnis .....	88
7.3	Abkürzungsverzeichnis .....	91

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Saatweizen

Weizen stellt das meist angebaute Getreide der Welt dar und ist für Menschen in vielen Ländern ein Grundnahrungsmittel. Im Anbaujahr 2008 wurden weltweit auf einer Fläche von 224 Millionen Hektar 679 Millionen Tonnen Weizen geerntet. Davon produzierten 2008 die fünfzehn größten Erzeugerländer 80 % (FAO, 2010). In Deutschland betrug die Erntemenge 21 Millionen Tonnen (Tabelle 1).

Tab. 1: Die größten Weizenproduzenten im Jahr 2008 weltweit (FAO, 2010)

Erzeugerland	Ernteertrag (Mio t)	Erzeugerland	Ernteertrag (Mio t)
China	112.463	Australien	21.397
Indien	78.570	Pakistan	20.958
Amerika	68.026	Türkei	17.782
Russland	63.765	England	17.227
Frankreich	39.001	Kasachstan	12.538
Kanada	28.611	Iran	10.000
Deutschland	25.988	Polen	9.274
Ukraine	25.885		

Der durchschnittliche Ertrag lag weltweit in der Vegetationsperiode 2007/2008 bei 2,8 t/ha, während in Deutschland 6,74 t/ha geerntet wurden (FAO, 2010). Neben dem am meisten produzierten Saatweizen (*Triticum aestivum*), werden andere Weizenarten wie Dinkel (*Triticum spelta*), Emmerweizen (*Triticum dicoccum*), Hartweizen (*Triticum durum*) vor allem zur Nahrungsmittelgewinnung angebaut.

*Triticum aestivum* entstand vor etwa 8000 Jahren im Gebiet des Fruchtbaren Halbmonds im vorderen Orient (Abbildung 1) (Feldmann, 2001).



Abb. 1: Der Fruchtbare Halbmond ([www.commonswiki.org](http://www.commonswiki.org))

Das Genom des Weizens besteht aus  $1,7 \times 10^9$  Basenpaaren (Arumuganathan und Earle, 1991). *T. aestivum* ist allohexaploid und setzt sich aus dem A-, B- und D- Genom zusammen. Insgesamt besteht das diploide Genom aus  $2x=6n=42$  Chromosomen. Mit Hilfe molekulargenetischer Analysen und immunologischer Tests konnte eine hohe Übereinstimmung zwischen dem A-Genom des *T. aestivum* mit *T. urartu* festgestellt werden, so dass *T. urartu* (AA) als Donor des A-Genoms von *T. aestivum* (AABBDD) angenommen wird (Konarev et al., 1979; Dvorák et al., 1993; Sallares und Brown, 1999).

Die Herkunft des B-Genoms konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Wahrscheinlich sind die Donoren des B-Genoms der Gattung *Aegilops* zugehörig. Ursprünglich wurde angenommen, dass das B-Genom von *Ae. searsii* stammt (Feldmann, 1978). Mit Hilfe molekularer Techniken konnte gezeigt werden, dass *Ae. searsii* nicht mit dem B-Genom des Emmerweizens *T. dicoccum* identisch ist (Ogihara und Tsunewaki, 1988). Durch Vergleiche von äußeren Merkmalen wurde von Sarkar und Stebbins (1956) sowie Rilay et al. (1958) *Ae. speltoides* als Donor des B-Genoms in Betracht gezogen. Erst 1990 konnte auf genomischer Ebene durch Analysen repetitiver Sequenzen gezeigt werden, dass das B-Genom große Ähnlichkeiten mit *Ae. speltoides* aufweist (Talbert et al., 1991 und 1995; Dvorák und Zhang, 1990; Daud und Gustafson, 1996). Durch die Kombination von *T. urartu* (AA) mit dem Donor des B-Genoms entstand der tetraploide Emmer, *T. turgidum* (AABB). Der Donor des D-Genoms ist *T. tauschii* zugeordnet. Durch Hybridisierung von *T. tauschii* (DD) mit *T. turgidum* (AABB) entstand letztendlich der Saatweizen *T. aestivum* (AABBDD) (Kimber und Feldmann, 1987; Feldmann, 2001).

## 1.2 Echter Mehltau bei Weizen

Beim Anbau landwirtschaftlicher Kulturen beeinflussen abiotische und biotische Faktoren den Ertrag und die Ertragsstabilität in starkem Maße. Während bei den abiotischen Faktoren unter anderem Hitze und Kälte sowie Trockenheit und Bodenversalzung eine große Rolle spielen, sind bei den biotischen Faktoren insbesondere die pilzlichen Erreger wie *Fusarium*, Braun-, Schwarz- und Gelbrost sowie *Septoria*-Arten und Echter Mehltau (*Blumeria graminis*) zu nennen.

Hoher Mehлтаubefall tritt insbesondere in den gemäßigten maritimen Klimaten mit feuchter und mäßig warmer Witterung auf. Der Befall mit Mehltau geht mit einer starken Schwächung der Pflanze einher und führt bei starkem Befall zu Ertragsverlusten von bis zu 25 % (Hoffman und Schmutterer, 1983). Solche Ernteeinbußen kommen heute wegen neuer, resistenter Sorten, Fungizideinsatz, Saatgutbeizung, Beseitigung von Ausfallgetreide sowie Vermeidung sehr hoher Bestandsdichten und N-Düngergaben (Mielke und Schöber-Butin, 1999) in diesem Ausmaß nicht mehr vor. Dennoch ist die Mehltaresistenz noch immer ein wichtiges Kriterium bei der Sortenentwicklung, -zulassung und -empfehlung. Die Bekämpfung von Echem Mehltau mit Fungiziden wird aufgrund ökonomischer und ökologischer Gründe kritisch beurteilt. Deshalb stellt die gezielte Kombination von Resistenzgenen gegen Mehltau in der Züchtung einen wichtigen Aspekt dar. Die in Sorten vorhandenen qualitativen Resistenzgene verlieren jedoch häufig innerhalb weniger Jahre ihre Wirksamkeit. Dieses Fortschreiten des Resistenzverlustes von Weizen gegenüber dem Echten Mehltau wird dabei von mehreren Faktoren beeinflusst: Viele in der Sortenentwicklung eingesetzte Resistenzen sind monogen vererbt. Des Weiteren hat Echter Mehltau eine sexuelle Vermehrungsphase, so dass schnell neue Kombinationen von Virulenzgenen entstehen können (Aubertot et al., 2006).

Echter Mehltau an Weizen produziert weiße bis graue Pusteln an der oberen, manchmal auch an der unteren Blattseite. Der größte Befall mit Mehltau ist meist an den unteren Teilen der Pflanze zu finden (Daamen, 1989). Von den befallenen unteren Blättern kann sich der Pilz in die oberen Blattetagen bis hin zur Ähre ausbreiten. Zu Beginn der Infektion keimen im Frühjahr die Konidien mit einem kurzen Keimschlauch aus (Abb. 2). Dabei sind optimale Bedingungen für die Infektion bei einer Temperatur von 15°C und hoher Luftfeuchte gegeben (Hoffman und Schmutterer, 1983). Nach der Bildung des Apressoriums bildet der Pilz ein Haustorium in der Epidermiszelle aus. Von dort breitet sich der Pilz mittels sekundärer Hypheninitialen und Apressorien aus. Es entstehen zuerst kleine runde Pusteln, welche manchmal von chlorotischem Pflanzengewebe umgeben werden.

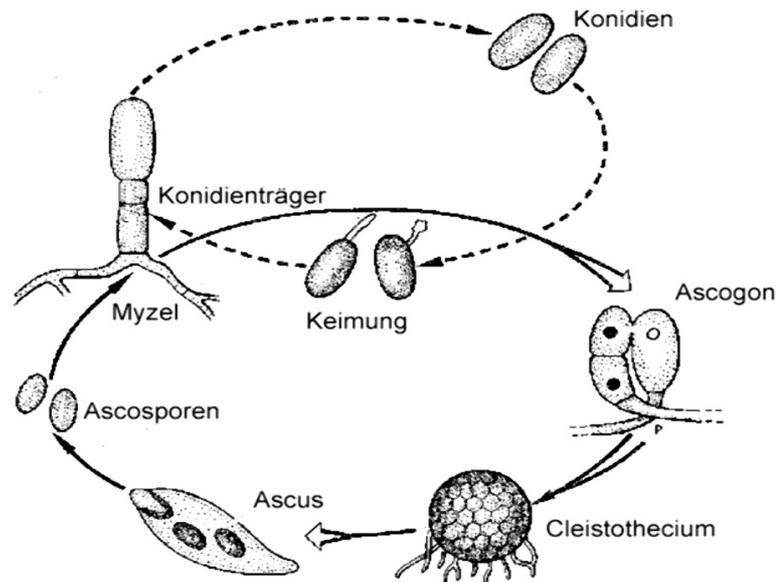


Abb. 2: Sexueller und asexueller Vermehrungszyklus von Echem Mehltau (Braun, 1995)

Bei trockenen Bedingungen bilden sich sieben Tage später asexuell entstandenen Konidien, welche leicht von Wind und Regen verbreitet werden können (Abbildung 2). Dadurch sind weitere Infektionen möglich (Schafer, 1987). Die Pusteln können, bei für den Mehltau günstiger Witterung, im Laufe der Zeit ganze Blätter vollständig bedecken. Ältere Pusteln sterben mit der Zeit ab und werden braun (Wiese, 1987). Mit fortschreitender Entwicklung werden in den grauen Mehltaupusteln die sexuellen Vermehrungsorgane, die Cleistothecien, mit Ascosporen zur Überdauerung gebildet.

### 1.3 Resistenz gegen den Weizenmehltau

Für den Befall muss der Pilz seinen Wirt erkennen können. Dabei spielen unter anderem die Zusammensetzungen der Wachsschichten, die Oberflächentopographie und verschiedene Phytohormone eine wichtige Rolle (Elstner et al., 1996). Um in die Pflanze eindringen zu können, müssen vom Pathogen zuerst Barrieren (z.B. Zellwand, Cuticula, antimikrobielle Substanzen) mit Hilfe physikalischer (z.B. Penetration) sowie enzymatischer Mittel (z.B. Cellulasen) überwunden werden. Diese Strukturen können von der Pflanze bei einem Befall mit Pathogenen verstärkt werden. Es erfolgt die Freisetzung toxischer Peptide und Phytoalexine, wodurch das Wachstum des Pilzes erschwert wird. Des Weiteren hemmen Enzyme, wie beispielsweise Chitinasen und in die pflanzliche Zellwand eingelagerte Phytoalexine, das Wachstum des Pathogens. Die vom Pilz durch den enzymatischen Verdau der Wirtszelle

freigesetzten Stoffe können dabei als Elicitoren zur Pathogenerkennung dienen (Hückelhoven, 2007; Osbourn, 1996; Hutcheson, 1998; Elstner et al., 1996). Bei den Elicitoren handelt es sich um Glycoproteine, Peptide, Lipide und Stoffwechselprodukte. Hinzu kommen endogene Elicitoren, wie z.B. hydrolytische Enzyme des Pathogens (Nürnberger und Brunner, 2002).

Bei der inkompatiblen Interaktion von Elicitoren mit der Pflanze wird eine Vielzahl von Abwehrreaktionen eingeleitet. Diese äußern sich zunächst durch die Aktivierung von Signalkaskaden. Dabei spielt eine Änderung des Membranpotentials, der Protonenflüsse, die Erhöhung der Calciumkonzentration, die Aktivität von MAP-Kinasen (mitogen aktivierten Proteinkinasen) und die Phosphorylierung von Proteinen eine wesentliche Rolle.

Ebenfalls sind Phytohormone und Stickstoffmonoxid sowie Salizylsäure wichtige Elemente in der Signaltransduktionskette. Insbesondere Jasmonat, Ethylen sowie Auxin sind bei Abwehrreaktionen beteiligt. So konnte bei Befall mit Echtem Mehltau bei Weizen eine Erhöhung des Auxingehaltes gemessen werden (Hückelhoven, 2007; Enyedi et al., 1992; Hammond-Kosack und Jones, 1996; Scheel, 1998).

Als Reaktion auf diese Signalkaskaden findet unter anderem die lokale Verstärkung von Zellwänden durch Papillenbildung statt. Diese setzt sich aus Suberin, Pektin, Cellulose, Lignin, Protein und Kallose zusammen. Kallose ist im Gegensatz zu den meisten Glucanverbindungen in der Pflanze ein  $\beta$ -(1,3)-Glucan. Da der Pilz in weiten Teilen ebenfalls aus  $\beta$ -(1,3)-Glucanen besteht, schädigt er sich selbst beim Eindringen an der Papille durch Enzyme, die  $\beta$ -(1,3)-Glucane abbauen können.

Eine weitere Methode zur Befallsreduktion ist die Synthese und Freisetzung von antimikrobiellen Substanzen. Solche sind in der Zellwand bereits vor dem Befall in niedrigen Konzentrationen vorhanden und tragen wesentlich zur basalen Resistenz bei. Diese Substanzen können Enzyme wie Chitinasen, Glucanasen, Proteasen darstellen. Des Weiteren werden oftmals Phytoalexine freigesetzt. Phytoalexine sind niedermolekulare Verbindungen wie Flavonoide, Terpenoide, Alkaloide, Stilbenoide, Polyacetylene und Isoflavone, welche unmittelbar am Infektionsort synthetisiert werden. Im Gegensatz dazu gibt es bereits antimikrobielle Substanzen, welche häufig in glycosylierter Form vorliegen. Bei Befall werden mit Hilfe hydrolytischer Enzyme die Zucker abgespalten, sodass die Substanzen an antimikrobieller Funktion gewinnen (Hückelhoven, 2007).

Nach der Erkennung des Pathogens findet bei der hypersensitiven Reaktion der 'oxidative burst' statt. Dieser äußert sich durch die rasche Anreicherung von Wasserstoffperoxid, Superoxidanion und dem Hydroxylradikal. Die Bildung dieser reaktiven Sauerstoffspezies (ROI) wirkt antimikrobiell und ist ein wichtiges Element bei der Vernetzung von Zellwandbestandteilen. ROI

ist an der Induktion der Synthese antimikrobieller Substanzen in der Pflanze wie zum Beispiel der Phenole beteiligt. Die Bildung von ROI ist eine Vorstufe des aktiven Zelltods. Dieses ist besonders bei biotrophen Krankheitserregern wie dem Echten Mehltau sehr wirkungsvoll, da der Pilz im abgestorbenen Gewebe nicht mehr leben kann (Levine et al., 1994; Jabs et al., 1997; Lamb und Dixon, 1997). Es konnte aber bei Infektionsversuchen mit sowohl resistenten als auch anfälligen Linien eine etwa gleich hohe Wasserstoffperoxid-Konzentration während der Keimschlauchbildung gemessen werden. Eine Akkumulation von ROI allein scheint deshalb zumindest nicht immer für den hypersensitiven Zelltod auszureichen (Heath, 1998; Hückelhoven und Kogel, 1998).

Die züchterisch genutzte qualitative Mehltaresistenz bei Weizen äußert sich häufig durch Chlorosen- und Nekrosenbildung als Folge des hypersensitiven Zelltods. Sie ist spezifisch und wird als vertikale Resistenz bezeichnet. Ihre Wirkung ist häufig schon bei Keimpflanzen des Weizens vorhanden. Die Resistenz ist bei qualitativen Resistenzgenen rassenabhängig und verhält sich nach der Gen-für-Gen-Hypothese (Flor, 1955).

Für die Induktion von Abwehrmechanismen ist eine Erkennung des Pathogens durch die Pflanze notwendig (Elstner et al., 1996). Für die Erkennung der Elicitoren durch spezifische Rezeptoren benötigt die Pflanze ebenfalls ein spezifisches Gen. Die Elicitoren sind häufig rassenspezifisch (Yamaguchi et al., 2000). Dieser Erkennungs-Reaktions-Mechanismus für die Resistenz ist Grundlage der Gen-für-Gen-Hypothese von Flor (1955).

Tab. 2: Wirt-Pathogen-Interaktion mit zwei Resistenz-/ Virulenzgenen

Av1/Av2=Avirulenzgen, a1/a2=Virulenzgen, R1/R2=Resistenzgen,  
r1/r2=Anfälligkeitgen, I=inkompatible Reaktion (resistent), K=kompatible Reaktion (anfällig)

<b>Wirt</b> <b>Pathogen</b>	<b>R1R2</b>	<b>R1r2</b>	<b>r1R2</b>	<b>r1r2</b>
<b>Av1Av2</b>	I	I	I	K
<b>Av1v2</b>	I	I	K	K
<b>v1Av2</b>	I	K	I	K
<b>v1v2</b>	K	K	K	K

Flor postulierte, dass jedem Resistenzgen im Wirt ein entsprechendes Virulenzgen im Pathogen gegenübersteht. Die Interaktion von mindestens einem Resistenzgen mit dem entsprechenden Avirulenzgen führt zur Abwehr des Pathogens. Hingegen führt das virulente Pathogen beim Wirt beim Fehlen des entsprechenden Resistenzgens zum Befall der Pflanze (Tabelle 2). Powers und Sando (1957 und 1960) konnten die Gen-für-Gen-Hypothese für qualitative Mehltaresistenzgene bei Weizen bestätigen. Sie ist Grundlage, um bestimmte Resistenzgene anhand der Wirt-Pathogen-Interaktionsmuster nach Inokulation durch ausgewählte Isolate zu identifizieren. Dieses Model führte zur Vorstellung, dass ein Avirulenzgen direkt mit dem Rezeptor interagiert, wodurch Abwehrreaktionen eingeleitet werden (Bent, 1996). Dennoch konnte man nur selten physikalische Interaktionen zwischen Avirulenzgen und Resistenzgen feststellen. Die Pathogenerkennung wird neuerdings mit der sogenannten Guardhypothese erklärt. Demnach bindet das Resistenzgen an ein weiteres Protein, dem "guardee". Dieses Protein tritt dabei in Interaktion mit dem Liganden des Pathogens, und verändert dabei seine Konformation, wobei anschließend das Resistenzgen aktiv wird (Abbildung 3) (Dangl und Jones, 2001).

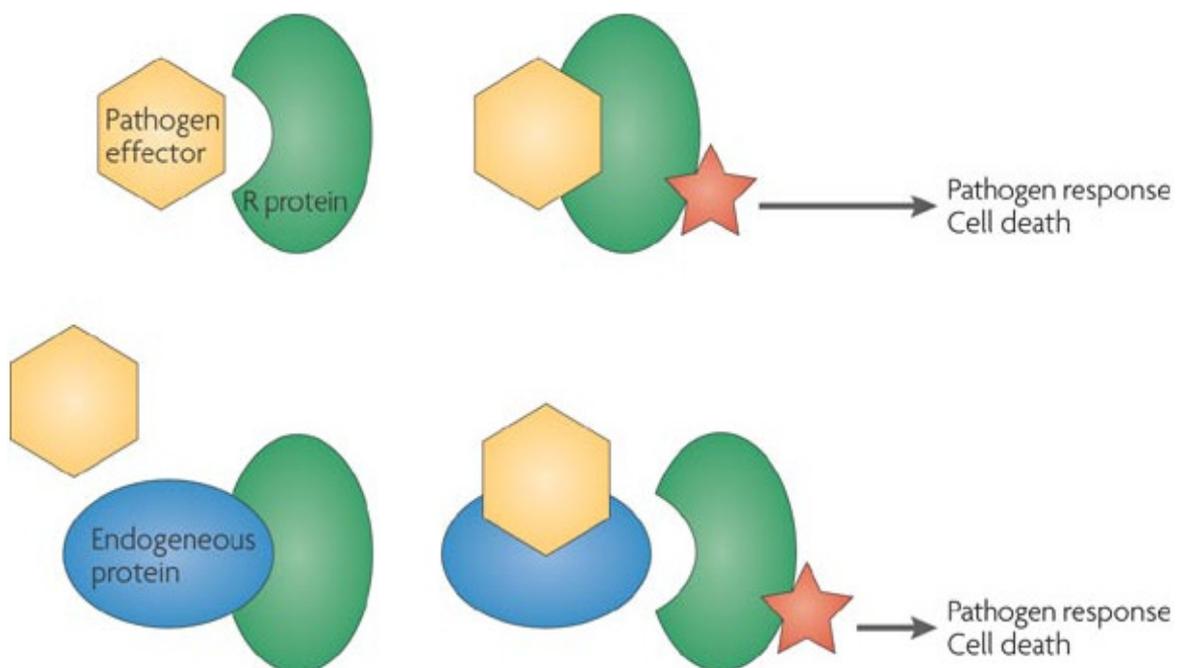


Abb. 3: Direkte Pathogenerkennung (oben) und Pathogenerkennung mit Guardprotein (unten) (Bomblies und Weigel, 2007). Bei der direkten Pathogenerkennung interagiert der Pathogeneffektor mit dem Resistenzprotein was eine Abwehrreaktion zur Folge hat. In der indirekten Pathogenerkennung kommt es zu einer Interaktion des Pathogeneffektors mit einem Guardprotein (blau). Die dadurch hervorgerufenen Konformationsänderung des Guardproteins führt zu einer Abwehrreaktion.

Viele Erkennungsrezeptoren bestehen aus Proteinen mit einigen sich wiederholenden Aminosäuresequenzen bei einem überwiegenden Anteil von Leucin, so genannten LRRs (leucine rich repeats) (Gomez-Gomez und Boller, 2000). In tierischen Systemen konnten ähnliche Rezeptoren, welche im Immunsystem eine wesentliche Rolle spielen, nachgewiesen werden (O'Neill und Greene, 1998).

Aufgrund der häufig bei Resistenzgenen vorkommenden LRRs werden diese als so genannte RGAs (resistance genes analogs) genutzt, um Kandidatengene für die Resistenz zu identifizieren (Gish und States, 1993; Quint et al., 2002; Mohler et al., 2002).

Besonders bei qualitativen Resistenzgenen ist die Wirt-Pathogen-Interaktion laufend einem schnellen evolutionären Prozess unterworfen, der mit einem Zusammenbruch der Resistenz einher geht. Dabei bilden sich Pathotypen mit Virulenz gegen häufig verwendete Resistenzgene heraus. Neue Virulenzen können durch Migration, Mutation und Rekombination in einem Anbaugebiet auftreten. Zur Änderung der Resistenzeigenschaften beim Weizen sind nur wenige Abweichungen in der Aminosäuresequenz der Resistenzgene notwendig. Lundqvist und Lundqvist (1992) konnten bei Mutationsversuchen eine Änderung des Virulenzspektrums nachweisen. So unterscheiden sich die Resistenzeigenschaften von Linien durch minimale Unterschiede in der Aminosäuresequenz im *Pm3*-Allel. Schon bei einem Unterschied von drei Aminosäuren zwischen den Resistenzgenen bei *Pm3d* und *Pm3e* ergab sich ein unterschiedlicher Befall nach der Inokulation mit ausgewählten Einsporisolen (Yahiaoui et al., 2006). Dass geringe Sequenzunterschiede für unterschiedliche Resistenzeigenschaften ausreichen, zeigt auch der Vergleich verwandter Resistenzgene. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der Gene *Pm3b*, *Pm3a*, *Pm3d*, sowie *Pm3f* untereinander zeigte einen maximalen Aminosäurenunterschied von 2,2 %. Die meisten Unterschiede in den Aminosäuresequenzen wurden an den Nukleotid-Bindungsstellen nachgewiesen (Srichumpa et al., 2005). Boyd et al. (2006) beobachteten nach Bestrahlung von Weizenpflanzen mit Neutronen Veränderungen der isolatspezifischen Resistenz gegenüber Gelb-, Braunrost- und Mehlauresistenzen eine Veränderung der isolatspezifischen Resistenz.

Elliot et al. (2005) konnten nachweisen, dass mehrere tausende Jahre konservierte Aminosäuresequenzabschnitte noch heute essentiell für die Funktion heutiger *mlo*-Resistenzgene sind.

Im europäischen Weizensortiment gibt es 39 Resistenzgenloci, welche im Weizengenom heterogen verteilt sind (Abbildung 4). Insbesondere die Resistenzgene *Pm2*, *Pm3*, *Pm4b*, *Pm5*, *Pm6* und *Pm8* kommen im deutschen Winterweizensortiment vor. Diese werden im Folgenden

eingehend erläutert. Das dominante *Pm2*-Gen wurde erstmals in der Sorte Ulka beschrieben und zuerst als *mlu* bezeichnet (Pugsley und Carter, 1953). Gleichzeitig konnte bei den Linien CI 12632 und CI 12633 ebenfalls ein dominantes Gen gefunden werden, welches *mlx* genannt wurde (Nyquist, 1963).

Briggle (1966b) konnte durch Kreuzungs- und Spaltungsanalysen zeigen, dass *mlx* und *mlu* zueinander allel sind. Daraufhin wurde *mlu* nach *Pm2* umbenannt. *Pm2* konnte später mit Hilfe der Monosomenanalyse auf Chromosom 5DS lokalisiert werden (McIntosh und Baker, 1970; Lutz et al., 1995).

*Pm3* wurde erstmals von Mains (1934) beschrieben. So wurde in der Sorte Chul als auch in der Sorte Sonora Mehlauresistenz nachgewiesen, die allelisch vererbt wurde. Bei der Sorte Sonora konnte eine rezessive Resistenz nachgewiesen werden (Mains, 1934). Bei anderen Versuchen wurde ein partiell dominantes Gen festgestellt und mittels Monosomenanalyse auf Chromosom 1A lokalisiert (Briggle, 1966a). Insgesamt konnten bisher 18 *Pm3*-Allele (*Pm3a-Pm3r*) nachgewiesen werden (Bhullar et al., 2009). Im Jahr 2004 wurde das Gen *Pm3b* kloniert und sequenziert (Yahiaoui et al., 2004).

In der Sorte Khapli fand Briggle (1960) ein Resistenzgen welches von Scharen et al. (1964) bezüglich der Wirt-Pathogeninteraktion mit 36 ausgewählten Mehlauisolaten charakterisiert wurde. Später wurde dieses als *Pm4* benannt (Briggle, 1966a). Bei den Linien TP 229, Weihenstephan M1, sowie Els konnte ebenfalls ein dominantes Resistenzgen nachgewiesen werden, welches als *mle* bezeichnet wurde (Wolfe, 1967; Jørgensen und Jensen, 1972). The et al. (1979) konnten die Allelie von *mle* und *Pm4* feststellen. *Pm4* wurde daraufhin zu *Pm4a* und *mle* zu *Pm4b* umbenannt. 2005 konnten Zhu et al. ein Resistenzgen von *T. carthlicum* feststellen. Durch eng gekoppelte Mikrosatelliten konnte es auf Chromosom 2AL lokalisiert werden. Aufgrund der Herkunft, der Lage im Chromosom sowie der Reaktion der Einsporisolate wurde von einem weiteren *Pm4*-Allel ausgegangen.

1933 konnte in der Weizensorte Hope eine Mehlauresistenz beobachtet werden. Nach Untersuchung von F<sub>2</sub>- bzw F<sub>3</sub>-Nachkommen der Kreuzung von Hope mit nahisogenen Linien mit *Pm1*, *Pm2*, *Pm3a* und *Pm4* und anschließenden Inokulationen mit ausgewählten Einsporisolaten wurde ein neues Resistenzgen nachgewiesen. Dieses wurde daraufhin als *Pm5* benannt (Mains, 1933; Lebsack und Briggle, 1974). Nach Kreuzungsversuchen konnte bei diesem Gen eine rezessive Resistenz nachgewiesen werden (Mains, 1934; Lebsack und Briggle, 1974). Durch Monosomenanalysen wurde das Gen dem Chromosom 7B zugewiesen (Law und Wolfe, 1966).

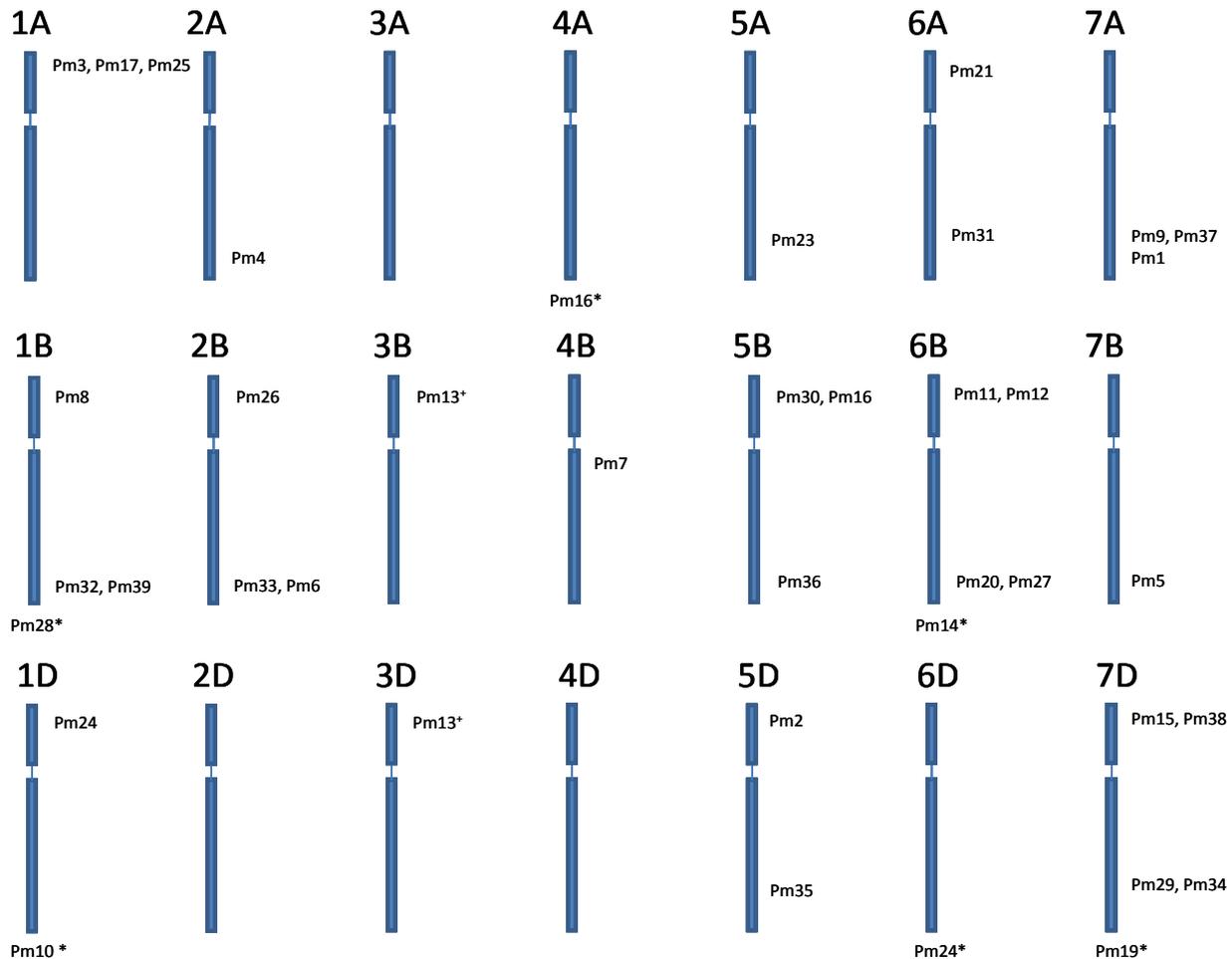


Abb. 4: Lage der Resistenzgene auf dem Chromosom. \*: Lage auf dem Chromosom nicht bekannt (GrainGenes, Stand 2010), +: *Pm13* auf Chromosom 3B ist vermutlich eine Translokation.

Zurzeit sind mehrere Allele auf dem *Pm5*-Locus bekannt (*Pm5a-Pm5e*) (Huang et al., 2003).

Das *Pm6*-Gen stammte ursprünglich aus *T. timopheevii* und wurde 1972 von Jørgensen und Jensen erstmals beschrieben. Es wurde in der Linie TP116 nachgewiesen und als *mlf* bezeichnet. Das Gen konnte dem Chromosom 2BL zugeordnet werden und wurde daraufhin als *Pm6* aufgeführt (Jørgensen und Jensen, 1973).

Um heute neue Gene zu identifizieren, wird mit Hilfe von Infektionsversuchen mit vielen Einsporisolen versucht, ein Wirt-Pathogen-Interaktionsmuster zu erstellen. Ist das ermittelte Virulenzspektrum neu und kann es auch nicht durch Kombination von bekannten Genen erklärt werden, so kann von einem neuen Resistenzgen ausgegangen werden. Unterstützt wird diese Prozedur durch die Identifizierung von zum Resistenzgen eng gekoppelten Markern. Diese Marker können mit nullitetrasomen Linien, also Linien denen jeweils ein Chromosomenpaar

fehlt, einem Chromosom zugeordnet werden. Des Weiteren erlauben Kopplungsanalysen mit Mikrosatelliten und anderen Markertypen, welche einem bestimmten Chromosom zugeordnet werden können, eine Lokalisierung auf einem Chromosom.

Die Anzahl der Resistenzgene in einer Sorte kann sehr groß sein. Aus diesem Grund ist es sehr aufwändig und schwierig in Sorten diese Resistenzgene durch die Wirt-Pathogen-Interaktionsmuster zu identifizieren (7.1). Molekulare Marker stellen ein wichtiges Werkzeug in der Identifizierung von Resistenzgenen dar, da sie kosten- und zeitsparend und die Resultate in der Regel auch eindeutiger sind. Für den endgültigen Nachweis eines neuen Resistenzgens sind Monosomenanalysen sowie Alleliekreuzungen (siehe Seite 18) notwendig.

Chromosomenabschnitte, welche mit der quantitativen Ausprägung einer Eigenschaft assoziiert werden können, nennt man QTL (quantitative trait loci). Im Gegensatz zu qualitativen Genen, wie die für die Blütenfarbe, ist die Merkmalsausprägung der QTL kontinuierlich. Bedeutsame QTL im Weizen sind zum Beispiel solche für Wuchshöhe und Halmstabilität. Auch QTL für den Ertrag sowie für Qualitätsmerkmale (Backqualität, Brauqualität) spielen eine wichtige Rolle. Ebenfalls hat die Resistenz beziehungsweise die Toleranz gegenüber abiotischen Faktoren wie Salz- oder Trockenstress eine bedeutende Rolle. Gleichzeitig spielen QTL für die Ausprägung von Resistenzen gegenüber Pathogenen wie *Fusarium* oder Mehltau eine wichtige Rolle.

Quantitative Resistenzen sind in ihrer alleinigen Resistenzwirkung im Vergleich zu qualitativen Resistenzgenen meist schwach. Sie sind in der Regel mit der horizontalen Resistenz gleichzusetzen, die polygen bedingt ist. Bei quantitativen Resistenzen wird häufig das sogenannte „slow mildewing“ beobachtet, das heißt, der Infektionsverlauf wird lediglich verlangsamt. Die Beurteilung der Resistenz wird deshalb auch anhand der Latenzzeit, Pustelzahl und Sporulation durchgeführt. Die exakte Lokalisierung von quantitativen Resistenzen durch Phänotypisierung ist schwierig, da qualitative Resistenzanalysen mit Einsporisolaten im Keimpflanzenstadium nicht möglich sind. Häufig wird in der Praxis die quantitative Resistenz mit der Adultresistenz gleichgesetzt. Diese bezieht sich jedoch definitionsgemäß nicht auf das Jugendstadium.

Mingeot et al. (2002) konnten zwei Adultresistenzgene in der Weizenlinie RE714 feststellen. Korff et al. (2005) identifizierten drei QTLs, die zu einer Senkung des Befalls um 51,5 %, 37,6 % und 16,5 % führten. Jakobson et al. (2005) gelang es ein dominantes Adultresistenzgen auf Chromosom 4A in der Nähe einer Translokation mit einem Bestimmtheitsmaß von 54 % festzustellen. Keller et al. (1999) konnten neben einem partiell wirksamen Resistenzgen am *Pm5*-Locus, 18 weitere QTLs in den Nachkommenschaften einer Kreuzung zwischen

freidreschenden Kulturweizen und Dinkel lokalisieren. Diese Ergebnisse unterstreichen die Hypothese, dass sich quantitative Resistenzen an Genorten von bisher identifizierten Genorten mit qualitativer Resistenz befinden können (Robertson, 1989; Young, 1996). Chantret et al. (1999) postulierten, dass rassenspezifische Resistenzgene durchaus Wirkung für die Altersresistenz haben können. Ähnliche Ergebnisse hatten Paillard et al. (2000) mit einer schwachen Resistenz von ehemals rassenspezifischen Haupt-QTL. Diese Ergebnisse bestätigen die These, dass quantitative Resistenzgene qualitativen Ursprungs sein können.

#### 1.4 Strategien der Resistenzzüchtung

Aufgrund der sich ständig ändernden Virulenzsituation ist eine genetisch breite Basis notwendig. Dies zeigt wie notwendig die Introgression von Resistenzgenen aus weiter entfernten Arten ist (Tab. 3).

Tab. 3: Mehlttauresistenzgene aus verwandten Arten.

Quelle	Resistenzgene
<i>T. monococcum</i>	<i>Pm1b</i>
<i>T. spelta</i>	<i>Pm1d</i>
<i>T. tauschii</i>	<i>Pm2</i>
<i>T. durum</i>	<i>Pm3h</i>
<i>T. dicoccum</i>	<i>Pm4a, Pm5a, Pm16, Pm26, Pm31</i>
<i>T. carthlicum</i>	<i>Pm4b</i>
<i>T. thimopheevii</i>	<i>Pm6, Pm27</i>
<i>S. secale</i>	<i>Pm8, Pm17, Pm20</i>
<i>Ae. speltoides</i>	<i>Pm12</i>
<i>Ae. longissima</i>	<i>Pm13</i>
<i>H. villosa</i>	<i>Pm21</i>
<i>T. baeoticum</i>	<i>Pm25</i>
<i>Ae. ovata</i>	<i>Pm29</i>

Bereits in den dreißiger Jahren fanden aufwendige Expeditionen, wie die deutsche Hindukusch Expedition 1935, die Nanga Parbat Expedition 1937, die Indien-Nepalexpedition 1937-38 sowie die Tibetexpedition 1939 statt. Die einfachste Introgression von Resistenzgenen erfolgt durch Rückkreuzung des Resistenzdonors mit dem rekurrenten Elter. So stammte die E-Weizensorte Enorm aus der zweimaligen Rückkreuzung des Resistenzendonors Chul/8\*Chancellor.

Aufgrund von unterschiedlichen Ploidiestufen ist es häufig nicht möglich Resistenzgene direkt in *Triticum aestivum* einzukreuzen. Deshalb wird das Genom der Wildform in eine amphidiploide Form, also mit zwei oder mehr verschiedenen Genomen, gebracht. So wird beispielsweise *T. tauschii* (DD) mit *T. durum* (AABB) gekreuzt, um Linien mit dem Genom ABD zu erhalten. Nach anschließender Chromosomenverdopplung durch Colchizinierung der Embryonen erhält man einen amphidiploiden Bastard, welcher nun für die klassische Züchtung zur Verfügung steht (Lutz, 1991). Die Introgression ist sehr langwierig und kostenintensiv. Gleichzeitig kann die Wirkung von Resistenzgenen im hexaploiden Genom reduziert sein, sodass ein Erfolg der Introgression von Resistenzgenen nicht sicher ist (Lutz, 1991).

## 1.5 Analyse der Resistenzgenetik

In der praktischen Züchtung werden bisher überwiegend die Resistenzeigenschaften durch Befallsbonitur im Feld bestimmt. Mit ihr können Resistenzeigenschaften unter den jeweiligen Umweltbedingungen erfasst und gleichzeitig wichtige andere Parameter, wie beispielsweise der Habitus beurteilt werden. Dabei dient der beobachtete Phänotyp der Linien als Entscheidungsmerkmal für weitere Zuchtstrategien. Um eine bessere Differenzierung der Linien hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften zu ermöglichen, wird häufig der Infektionsdruck erhöht. Dies geschieht unter anderem durch den gemeinsamen Anbau mit anfälligen Linien, zum Beispiel als Infektionsstreifen. Bei komplexen Züchtungen, wie der Kombination von mehreren Mehltaresistenzgenen (Pyramidisierung) erlaubt eine reine Phänotypisierung häufig keinen Schluss auf die Art und der Anzahl der Resistenzgene in einer Linie. Deshalb ist gerade in solchen Fällen die Kenntnis über die Resistenzgene in den Linien von Vorteil. Eine Möglichkeit, Resistenzgene in Linien zu bestimmen, ist die Analyse dieser durch Inokulation von Blattsegmenten mit Einsporisolaten (Heun und Fischbeck, 1987; Hovmøller, 1989; Huang et al., 1997; Lutz et al., 1992; Limpert et al., 1994; Zeller et al., 1993). Durch den Vergleich von resistenzgenspezifischen Befallsmustern der Linien mit denen von Pflanzen mit definierten Resistenzgenen können die Resistenzgene der Linien identifiziert werden. Von großem Nachteil ist, neben der notwendigen hohen Anzahl von sehr gut charakterisierten Einsporisolaten, eine verhältnismäßig lange Analysedauer, sowie die Notwendigkeit der ständigen Erhaltung der Isolate. Hinzu kommt die eingeschränkte Nachweismöglichkeit von Resistenzgenen in Linien

mit mehreren Resistenzgenen. Molekulare Marker können schnell, eindeutig und somit wirtschaftlich in der Züchtung Informationen über Resistenzgene in einer Pflanze geben.

Häufig wurde bei der klassischen Resistenzgenanalytik die sogenannte Monosomenanalyse zur Lokalisierung von Resistenzgenen benutzt. Dabei werden die monosomen Linien der anfälligen Sorte Chinese Spring (Sears, 1954) mit resistenten Linien bestäubt. Befindet sich das Resistenzgen auf dem Chromosom des entsprechend monosomen Kreuzungspartners wird die Kreuzung 'kritisch' genannt. Bei unkritischen Kreuzungen beträgt in der F<sub>2</sub>-Generation bei einem dominanten Gen das Spaltungsverhältnis entsprechend dem normalen Spaltungsverhältnis nach Mendel resistenter Linien zu anfälligen Linien 3:1, bei kritischen Kreuzungen hingegen sind nur nullisome Linien anfällig. Aufgrund der niedrigen Fertilität der Pollen mit 20 Chromosomen sind nur ca. 3 % der Pflanzen nullisom. Somit beträgt das Spaltungsverhältnis von resistenten zu anfälligen Linien 97:3 (Knott, 1987).

Liegt ein neues Resistenzgen auf einem Chromosom mit einem bereits bekannten Resistenzgen, so wird das neue Resistenzgen auf Allelie zu diesem überprüft. Dabei werden Linien mit dem bekannten Resistenzgen mit Linien mit dem neuen Resistenzgen gekreuzt. Die F<sub>2</sub>-Generation dieser Kreuzung wird anschließend mit avirulenten Einsporisolen für beide Gene inokuliert. Sind keine anfälligen Linien zu erkennen, handelt es sich bei dem neuen Resistenzgen entweder um ein sehr eng gekoppeltes Resistenzgen oder um ein neues Allel. Monosomenanalysen und Alleliekreuzung sind grundlegende Techniken um Resistenzgene zu lokalisieren. So konnten Hsam et al., (2001) mittels Monosomenanalyse ein Resistenzgen auf dem *Pm5*-Locus detektieren. McIntosh und Baker (1970) konnten das Resistenzgen *Pm2* auf Chromosom 5D lokalisieren.

Um die notwendigen phänotypischen Daten für die molekulargenetische Kartierung von Resistenzgenen zu erlangen, gibt es mehrere Wege. Zum einen gibt es die Möglichkeit von Inokulationsversuchen von Keimpflanzen mit Einsporisolen. Sie sind bei geeigneter Wahl bei qualitativen Resistenzgenen meist eindeutig und aufgrund ihrer relativ einfachen Handhabung sehr beliebt. So wurden beispielsweise von Hartl et al. (1993, 1995, 1999) und Ma et al. (1994) für die Hauptgene *Pm3*, *Pm2*, *Pm1* Selektionsmarker entwickelt. Huang et al. (2000) konnten ebenfalls mit dieser Technik *Pm24* charakterisieren. Inokulationsversuche mit Einsporisolen erlauben die Detektion von heterozygoten Linien, was für die Beurteilung der genetischen Distanz zum Resistenzgenmarker wichtig ist. Die Berechnung der genetischen Abstände qualitativer Gene kann aufgrund der Eindeutigkeit der Ergebnisse einfach mittels der

Rekombinationsfrequenz berechnet werden. Jedoch können durch Einsporisolate, mit wenigen Ausnahmen (Chantret et al., 2000), nur qualitativ wirksame Resistenzgene festgestellt werden. In letzter Zeit wurde immer mehr Aufwand in die Entwicklung von Markern gekoppelt mit qualitativ wirksamen Resistenzgenen investiert. Die Bonitur von Linien im Feldbestand erlaubt neben den qualitativen Resistenzgenen auch die Erfassung von quantitativen Resistenzen im adulten Stadium, welche mit Einsporisolaten nicht ohne weiteres ermittelt werden können.

Für die Markerentwicklung werden entweder mindestens  $F_2$ -Nachkommenschaften oder rekombinante Inzuchtlinien (RILs) verwendet. Hartl et al. (1999) benutzten dabei erfolgreich  $F_2$ -Nachkommenschaften zur Detektion von molekularen Markern für *Pm1c* und *Pm4a*. Die Verwendung von RILs zur Markerentwicklung ist ebenfalls eine häufige Anwendung. So entwickelten Donini et al. (1995) Marker für *Pm13*. Beide Ausgangsmaterialien haben den Nachteil, dass aufgrund von Heterozygotie der Linien Markeranalysen erschwert werden können. Durch den Einsatz von doppelhaploiden Linien (DHs) in der Züchtungsforschung können solche Probleme umgangen werden. Dabei wird durch die Behandlung von haploiden Pflanzen mit dem Spindelgift Colchizin eine Verdoppelung des Chromosomensatzes herbeigeführt, sodass man reinerbige diploide Pflanzen erhält. Für die Herstellung der haploiden Pflanzen werden aus haploiden unreifen Pollen Pflanzen kultiviert. Eine neuere Methode zur Erstellung von DHs ist die sogenannte Weizen x Mais-Methode (Bitsch et al., 1998). Dabei werden kastrierte Weizenblüten mit Maispollen bestäubt. Während der ersten Zellteilung der hybriden Zygoten werden die Chromosomen des Mais eliminiert, sodass man haploide Embryonen erhält, die dann wieder mit Colchizin behandelt werden müssen.

Um einen molekularen Marker für Mehltaresistenz zu entwickeln, muss eine DNA-Sequenz gefunden werden, welche eng an diesen Resistenzgenort koppelt. Eine möglichst enge Kopplung der Marker zum Resistenzgen ist erstrebenswert, um eine Minimierung von Rekombinationen zu erreichen (Langridge et al., 2001). Die starke Wiederverwendung von Sorten in der Züchtung führte zu einem niedrigen Polymorphiegrad im Weizen. Aufgrund dieser Tatsache ist eine Entwicklung von sehr eng gekoppelten Markern mit hohem Aufwand verbunden (Chao et al., 1989; Hart et al., 1990).

Für die Ermittlung von eng gekoppelten Resistenzmarkern werden unterschiedliche Strategien angewandt. Bei der Kartierung wird von jeder einzelnen Linie der Population eine Genomanalyse durchgeführt. Mit Hilfe der Kopplungsanalyse werden daraufhin der Kopplungsabstand zwischen einzelnen Markern und dem Befall ermittelt. Mit weniger

analytischem Aufwand ist die Analyse von wenigen ausgesuchten Linien mit ausschließlich sehr ausgeprägtem Befall bzw. Resistenz verbunden. Für die Kartierung werden hierbei nur Linien mit extrem niedrigem sowie extrem hohem Befall zur Analyse herangezogen. Am arbeitssparendsten ist die „bulked segregant analyse“ (Michelmore et al., 1991). Bei dieser Technik werden jeweils Mischungen („bulks“) von stark anfälligen Linien und sehr resistenten Linien erstellt, welche molekularanalytisch untereinander verglichen werden. Nicht gekoppelte Sequenzen sind unabhängig von der Resistenz verteilt und kommen deshalb, abhängig von der gewählten Linienanzahl, mit hoher Wahrscheinlichkeit in beiden Mischungen vor. Hingegen sind fast ausschließlich zum Resistenzgen gekoppelte Marker in nur einem der „bulks“ zu finden.

Die Lokalisierung eines Markers kann über mehrere Methoden erfolgen. Marker, die in der Sorte Chinese Spring vorhanden sind können unter Verwendung von nullitetrasonen Linien von Chinese Spring (Sears, 1954), welchen jeweils ein bestimmtes Chromosomenpaar fehlt, den jeweiligen Chromosom zugeordnet werden. Fehlt das entsprechende Chromosomenpaar mit dem Markerloкус, fehlt das Markerfragment. Ditelosome Linien ermöglichen die Bestimmung des Chromosomenarms.

Chantret et al. (2000) detektierten in der Linie RE714 ein Resistenzgen. Dabei wurden die gebildeten „bulks“ mit Mikrosatelliten untersucht. Hartl et al. (1999) konnten einen AFLP-Marker (amplified fragment length polymorphism) in enger Kopplung zu dem RFLP-Marker *Xwhs178* auf Chromosom 7AL feststellen und die Allelie von *Pm1a* und *Pm1c* verifizieren.

Identifizierte, zu Resistenzgenen eng gekoppelte Marker müssen häufig in einfache, schnelle und reproduzierbare Analyseverfahren weiterentwickelt werden. Dabei bietet sich die Pyrosequencingmethode an, welche sich zur Detektion kleiner Basenpaarunterschiede (SNPs) eignet. Allgemein betrachtet handelt es sich um eine Sequenzierung kurzer Abschnitte aus spezifischen Amplifikaten. Kann das zugegebene Nukleotid bei der Doppelstrangsynthese eingebaut werden, wird Pyrophosphat freigesetzt, was durch darauf folgende enzymatische Reaktionen als Lichtblitz wahrgenommen werden kann. Pyrophosphat reagiert dabei mit Hilfe der ATP-Sulfurylase zu ATP. Diese reagiert wiederum mit Luciferin unter Abspaltung von Pyrophosphat bei Lichtemittierung zu Oxiluciferin. Dieses freigesetzte Pyrophosphat kann wiederum mit Hilfe der ATP-Sulfurylase sowie der Luciferase

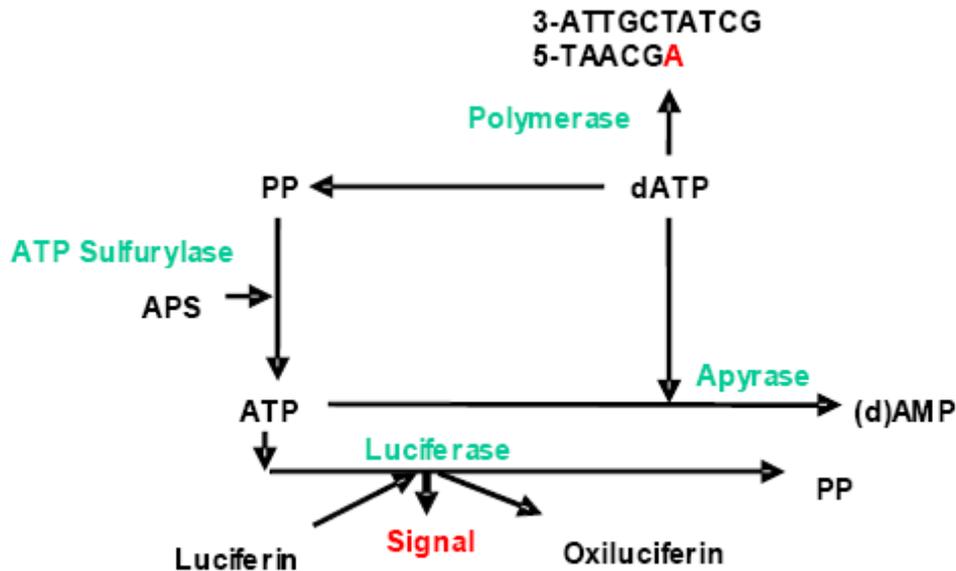


Abb. 5: Reaktionsvorgänge beim Pyrosequencing

wiederum unter Bildung von Pyrophosphat eine weitere Lichtemittierung auslösen. Diese andauernde zyklische verlaufende Reaktion ist unerwünscht und wird mit Hilfe der zugegebenen Apyrase unterbunden. Dieses Enzym reagiert mit ATP zu AMP, sodass diese Reaktion schnell reduziert wird. Des Weiteren reagiert dieses Enzym mit den verbliebenen dNTPs zu dNMP. Somit sind bei der Zugabe des nächsten Nukleotids keine störenden Produkte enthalten (Abbildung 5).

Neben der klassischen Markerentwicklung wird immer häufiger versucht die Sequenz der Resistenzgene zu ermitteln. Beim sogenannten „map based cloning“ werden mit Hilfe einer großen Population möglichst viele Marker im Bereich des Gens angereichert (Young, 1990). Anschließend wird ein BAC- oder YAC-Klon gesucht, welcher mit der Markersequenz hybridisiert. Über Klonierung der Randsequenzen und Hybridisierung wird nach weiteren, sehr eng gekoppelten Markern gesucht. Diese werden in sehr großen Populationen auf ihren genetischen Abstand hin überprüft. Im Idealfall können Marker bestimmt werden, die von einem Klon stammen und das Resistenzgen auf beide Seiten genetisch und physikalisch eingrenzen. Yahiaoui et al. (2004) gelang es mittels „chromosome walking“ *Pm3b* zu identifizieren und zu klonieren. Dabei nutzten sie die bereits bekannten zu *Pm3b* eng gekoppelten RFLP-Marker WHS179 und BCD1434 als Ausgangssequenzen (Hartl et al., 1993; Ma et al., 1994). Aufgrund der relativ großen Abstände zum Resistenzgen war vorerst ein „map based cloning“ der Resistenzgene nicht möglich. Entsprechend wäre eine aufwändige Feinkartierung als

Zwischenschritt notwendig. Krattinger et al. (2008) konnten mit Hilfe der zu *Lr34* eng gekoppelten Mikrosatelliten GWM1220 und SWM10 in *Brachypodium sylvaticum* vier proteinkodierende Sequenzen ermitteln (Bossolini et al., 2006). Ein Vergleich dieser Sequenzen mit „wheat expressed sequence tags“ in Weizen ermöglichte die Identifizierung analoger Sequenzen, welche für das „chromosome walking“ mit BAC-Klonen benutzt wurden.

Die Identifikation von Mehltaresistenzgenen durch die Expressionsanalysen ist mit einem hohen experimentellen Aufwand verbunden, da die Resistenzgene zumeist nur schwach und/oder konstitutiv exprimiert werden. Aufgrund von verbesserten analytischen Methoden konnte aber in letzter Zeit ein wesentlicher Fortschritt erzielt werden. Vor kurzem konnte eine cDNA-Bibliothek mit 13000 ESTs aus Gerstenpflanzen erstellt werden. Bei einer darauffolgenden Expressionsanalyse mit Mehltausisolaten an Gerstenpflanzen konnten dabei 102 differenziell exprimierte Gene detektiert werden. 11 davon wurden als mehltauspezifisch angegeben (Eichmann et al., 2006). Solche cDNA-Bibliotheken können in Zukunft für die Auswertung von Expressionanalysen herangezogen werden. Caldo et al. (2004) konnten mittels nah-isogener Linien eine Unterdrückung der mRNA-Expressionen bei anfälligen Pflanzen 16 h nach der Inokulation in der Epidermis feststellen. Um Expressionsanalysen zu erleichtern, wurden inzwischen für jedermann zugängliche Datenbanken zur Analyse von ESTs zur Verfügung gestellt ([www.BarleyBase.org/](http://www.BarleyBase.org/)).

Zur Analyse der Funktion von bekannten Genen, aber auch von Kandidatengen wird die sogenannte TILLING-Technik (targeting induced local lesions in Genomes) angewandt (McCallum et al., 2000). Dabei werden durch Mutagenisierung großer Populationen bei manchen Linien Veränderungen in der Resistenz bewirkt. Mittels dem Enzym *Ce1*-Nuklease I, welches Fragmente an Einzelsträngen schneidet (Till et al., 2004), können bekannte, mutierte Gene identifiziert werden. Durch die Phänotypisierung kann die Wirkung der Mutation auf die Resistenz festgestellt und somit die Funktionalität in der Pathogenabwehr erörtert werden. Seltener Nebeneffekt für die Züchtung könnte die Erzeugung neuer Resistenzgene sein. Nachteilig ist der dafür große zeitliche und finanzielle Aufwand. Ein weiterer Nachteil der TILLING-Technik ist der hohe Anteil von orthologen Genen im Weizengenom. Als Folge amplifizieren viele Primer mehrere Fragmente, welche aufgrund ihrer starken Ähnlichkeit Heteroduplexe bilden, die nicht auf Mutation zurückzuführen sind (persönliche Mitteilung, Schmolke).

Eine weitere Möglichkeit der Markerentwicklung stellt das Arbeiten mit konservierten orthologen Genen dar (COS). Dabei werden mit Hilfe von Primern möglichst alle orthologen Gene erfasst, welche für eine Resistenz verantwortlich sein können. Eine anschließende vergleichende Analyse der Fragmente mittels SNP-SSCP erlaubt eine Differenzierung der Resistenzgene auch bei Punktmutationen (Bertin et al., 2005). Bei der SNP-SSCP werden orthologe Gene nach deren Sekundärstruktur aufgetrennt und Mutationen durch ein verändertes Bandenmuster detektiert.

## 1.6 Zielsetzung

Unter den zugelassenen Winterweizensorten sind Sorten, die gegen den Weizenmehltau sehr resistent sind und deren Resistenzgenetik nicht charakterisiert ist. Die darin wirksamen Resistenzgene sind für die praktische Züchtung von besonders großem Interesse. Wichtigste Grundlage für die phänotypische Evaluierung sollen in diesere Arbeit Feldversuche unter natürlichen Bedingungen sein, um die Adultpflanzenresistenz zu erfassen, die auch Gegenstand der Sortenzulassung und die wichtigste Resistenzkomponente im Anbau ist. Speziell Sorten und Linien mit unbekanntem Resistenzgenen sollen mit Hilfe von molekularen Markern charakterisiert werden. Ein hoher Anteil der Sorten beinhaltet die Resistenzgene *Pm4b*, *Pm5* und *Pm6*. Da die Resistenzeigenschaften der Sorten mit diesen Genen stark unterschiedlich sind, soll deren Wirkung durch dazu gekoppelte molekulare Marker näher evaluiert werden. Des Weiteren sollen durch diese Arbeit molekulare Marker identifiziert werden, die den Zuchtfortschritt im Rahmen der markergestützten Selektion beschleunigen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial

Zur Evaluierung der Mehltaresistenzen wurden die Nachkommenschaften der Kreuzungseltern Atlantis/Cortez, Dobros/Kalistos, Classic/G93012, Dekan/90018, Convent/92422 und K2/Audace//Audace untersucht. Diese enthalten zum Teil bekannte Resistenzgene. Dabei handelte es sich bei der Kreuzung von Atlantis/Cortez um 91 doppelhaploide Linien. Von der F<sub>5:6</sub>-Generation der Kreuzung Dobros/Kalistos sowie der F<sub>4:5</sub>-Generation der Kreuzung Convent/92422 wurden 120 Linien verwendet. Von der Population von Classic/G93012 wurden 140 Linien der Generation F<sub>4:5</sub> angebaut. Ebenfalls wurden von der Kreuzung Dekan/90018 79 Linien der Generation F<sub>5:6</sub> ausgesät (Tabelle 4). 80 DH-Linien aus der Rückkreuzung K2/Audace//Audace wurden angebaut. Die Sorten Cortez, Classic, Dekan, Dobros, Convent und K2 dienten dabei als Resistenzendonoren. Als anfällige Kreuzungseltern dienten die Sorten Atlantis, Kalistos und Audace, sowie die Linien 92422, G93012 und 90018 (Tabelle 4).

Tab. 4: Verwendete Populationen

Kreuzung	Herkunft	Prüfgeneration	Linienzahl
Atlantis/Cortez	LfL Freising	DH-Population	91
Dobros/Kalistos	Saatzucht Strube	F <sub>5:6</sub>	120
Classic/G93012	LfL Freising	F <sub>4:5</sub>	140
Dekan/90018	LfL Freising	F <sub>5:6</sub>	79
Convent/92422	LfL Freising	F <sub>4:5</sub>	120
K2/Audace//Audace	Saatzucht Schweiger	DH BC <sub>1</sub>	80

### 2.2 Feldversuche

Die Versuchstandorte für die Evaluierung des Mehltaubefalls waren Söllingen [Saatzucht Strube] nahe Helmstedt, Feldkirchen [Saatzucht Schweiger] nahe Moosburg, Lenglern [Saatzucht Strube] nahe Göttingen, sowie Pulling [LfL] nahe Freising. Die Kreuzungslinien wurden, wie in Tabelle 5 angegeben, in unterschiedlichen Jahren an den oben angegebenen Standorten geprüft. Die Feldprüfungen wurden in Doppelreihen mit 1,5 m Länge bei einer Fläche von 0,6 Quadratmetern mit zwei Wiederholungen in einer randomisierten Blockanlage

angelegt. Insgesamt bestand jedes Saatgutmagazin aus es sechs Doppelreihen mit jeweils fünf Nachkommenschaften der jeweiligen Kreuzungseltern und als Kontrolle die moderat anfällige Sorte Batis. Zur Erfassung der Infektionsintensitäten wurde jede Linie bonitiert (Abbildung 6).

Tab. 5: Anbauorte von 2003-2005

Anbauorte	Pulling	Söllingen		Feldkirchen				Lenglern
	LfL	Saatzucht Strube		Saatzucht Schweiger				Saatzucht Strube
Anbaujahr	2003	2003	2004	2000	2003	2004	2005	2009
Atlantis/Cortez	+		+			+		+
Dobros/Kalistos		+	+		+	+	+	
Classic/G93012		+	+		+	+		
Dekan/90018		+	+		+	+	+	
Convent/92422		+	+		+	+		
K2/Audace//Audace				+	+	+		

Die Befallsskalierung war von eins bis neun, wobei Linien mit der Boniturnote eins nicht und Linien mit der Boniturnote neun vollständig befallen waren. Der genaue Boniturtermin schwankte witterungsbedingt zwischen den einzelnen Jahren und Orten um Anfang Juni.



Abb. 6: Weizen im Feld stark mit Weizenmehltau befallen

### 2.3 Infektionstests mit Einsporisolaten

Zur genauen Charakterisierung der Populationen auf spaltende qualitative Keimlingsresistenzen wurden manche Versuche mit Einsporisolaten (Inokulierung der Elternlinien sowie die Nachkommenschaften der Population Atlantis/Cortez und Dobros/Kalistos) an Blattsegmenten von Dr. Kerstin Flath (JKI), durchgeführt (Tabelle 6 und Anhang 7.1) (Bartels und Backhaus,

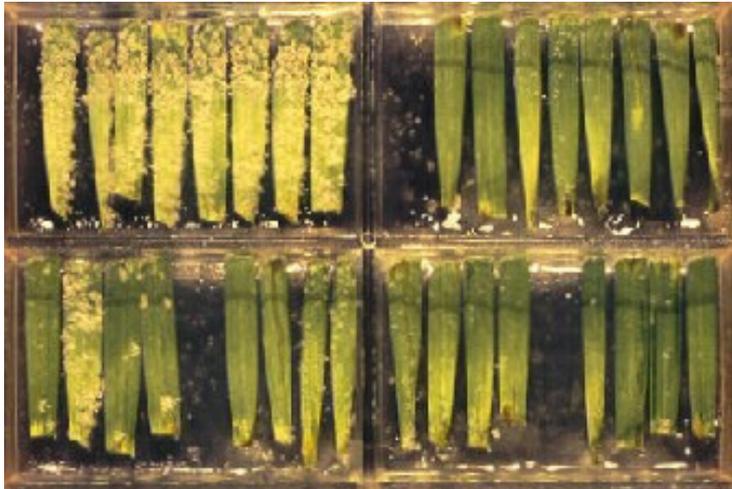


Abb. 7: Mit Einsporisolaten inokulierte Weizenblätter auf Benzimidazol-Agar

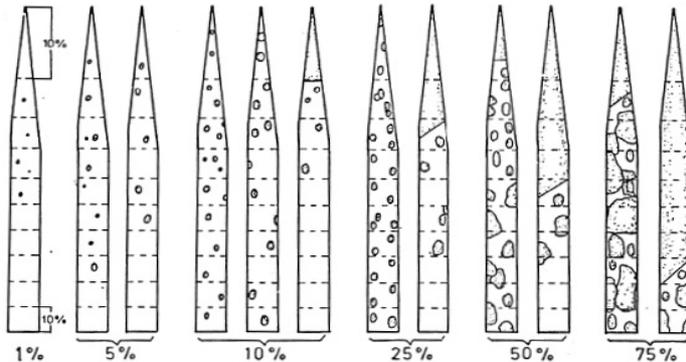


Abb. 8: Darstellung zur Ermittlung des prozentualen Mehлтаubefalls (Anonym, 2003a)

ermittelt wurde, erfolgte die Beurteilung des Mehлтаubefalls von Dr. Kerstin Flath wie in Tabelle 6 dargestellt.

Die Mehлтаukonidien wurden in Anlehnung an Aslam und Schwarzbach (1980) entweder in einem Inokulationsturm (Innenmaß: Länge 54 cm x Breite 54 cm x Höhe 90 cm) mit einem zylindrischen Aufsatz aus Plexiglas oder in einem Plexiglaszylinder (Radius ca. 7 cm, Höhe ca. 20 cm) durchgeführt. In diesen wurden die Einzelsporen mit Hilfe einer Luftpumpe verblasen, welche sich anschließend auf den Blättern verteilten. Die Petrischalen wurden daraufhin für zehn

2002; Felsenstein, 1991). Die Mehлтаuisolate für die eigenen Versuche am Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung wurden von Dr. Sai Hsam (TU-München) zur Verfügung gestellt. Als Kontrollpflanze sowie zur Vermehrung der Mehлтаuisolate wurde die mehltauanfällige Weizensorte Chancellor (Briggle, 1969) eingesetzt. Aus dem mittleren Teil des Primärblattes der 10 Tage alten Pflanzen wurden mit einer Rasierklinge 3 cm lange Blattstücke geschnitten und anschließend in durchsichtige Kästen (Grundfläche 20 x 10 cm mit je 12 Abteilen) oder in Petrischalen auf Benzimidazol-Agar (6 g Agar und 35 mg Benzimidazol/Liter Wasser) gelegt (Abbildung 7). Während in den Inokulationsversuchen in Weihenstephan die befallene Blattfläche

Tage bei 18°C und einer ständigen Belichtung von 10 E/m<sup>2</sup> inkubiert. Anschließend wurde der Befall, nach dem in Abbildung 8 und Tabelle 6 dargestellten Schema, bonitiert. Sporenisolate, die zwischen den Elternlinien der jeweiligen Kreuzungen differenzierten, wurden zu Infektionstests bei der entsprechenden Population ausgesucht. Durch die Verwendung der so ausgewählten Sporenisolate ergaben sich für die untersuchten Populationen individuelle Virulenzmuster (7.1). Diese Virulenzmuster der Populationen erlaubten Rückschlüsse auf spaltende Resistenzgene.

Um Hinweise auf möglicherweise bereits bekannte Gene in den Kreuzungseltern zu bekommen, wurden Virulenzmuster der Kreuzungseltern mit den Virulenzmustern von Linien mit bekannten Resistenzgenen verglichen.

Tab. 6: Bewertungsschema der Boniturnoten (Kerstin Flath, JKI; nach Jahoor, 1986)

Befallstyp	Myzelwachstum	Sporulation	Entwicklung von Chlorosen und Nekrosen	Einstufung als:
1	kein	keine	vorhanden	resistent
1-2	schwach	keine	vorhanden	resistent
2	mittelmäßig	schwach	vorhanden	resistent
2-3	mittelmäßig	mittelmäßig	vorhanden	resistent
3	stark	vorhanden	vorhanden	anfällig
3-4	stark	vorhanden	vorhanden	anfällig
4	stark	keine	keine	anfällig

## 2.4 DNA-Extraktion

Zur Gewinnung von DNA aus Weizenpflanzen wurden von Blättern aus acht Pflanzen einer Linie Segmente entnommen und gekühlt vom Feld transportiert. Danach fand eine Gefriertrocknung des Blattmaterials im Vakuum bei 0,005 mbar für 2 Tage statt. Das trockene Blattmaterial wurde anschließend für 2 min in einer Kugelmühle gemahlen. Zu den 0,5 g getrocknetes Blattmaterial erfolgte eine Zugabe von 15 ml CTAB-Extraktionspuffer. Die Suspension wurde vorsichtig gemischt und anschließend 1 h bei 65°C inkubiert. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 15 ml Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 versetzt. Nach kurzem Mischen der Proben wurde die Suspension mit Hilfe eines Überkopfschüttlers 15 min zur Extraktion von hydrophoben Substanzen sowie Proteinen gemischt. Anschließend

erfolgte die Phasentrennung der Probe durch Zentrifugation bei 5000 g für 10 min. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und der Rest verworfen. Zum Entfernen von störender RNA wurden zur Lösung 10 U RNase gegeben und 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das anschließende Ausfällen der DNA geschah durch eine vorsichtige Zugabe von 5 ml einer -20°C kalten Lösung, bestehend aus 76 % Isopropanol sowie 0,2 M Natriumacetat-Trihydrat. Die Lösung wurde daraufhin zum Ausfällen der DNA für 1 h im Gefrierschrank aufbewahrt. Mit einer Pasteurpipette wurde die ausgefällte DNA aus der Lösung genommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml 10 mM Ammoniumacetat sowie 76 % Ethanol überführt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 20 min bei RT und daraufhin eine Zentrifugation für 2 min bei 8000 g. Die Lösung wurde vorsichtig dekantiert, so dass sich nur noch ein Pellet im Reaktionsgefäß befand. 1 ml 76 % Ethanol wurde dazu gegeben und nach kurzem Schwenken 2 min bei 8000 g zentrifugiert. Danach wurde die flüssige Phase wiederum vorsichtig verworfen. Das Entfernen von Restalkohol wurde durch Trocknung der Probe für ca. 15 min im Vakuum erreicht. Daraufhin wurde die DNA in 1 ml TE-Puffer mindestens 12 h bei -4°C gelöst.

Zur Kontrolle der DNA-Qualität und zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde 10 µl gelöste DNA mit 1 µl Loading-Dye vermischt. Die Proben sowie ein Lambda x HindIII Standard wurden auf ein 1 % -iges Agarosegel (1 g Agarose pro 100 mL TE-Puffer) mit 0,005 % Ethidiumbromid aufgetragen. Die Elektrophorese fand 6 h lang bei einer Spannung von 30 V statt. Anschließend wurde das Agarosegel mit Hilfe eines Laserscanners gescannt. Durch den Vergleich der Intensität der Fragmente mit den Fragmenten des Lambda x HindIII Standards erfolgte eine Abschätzung der DNA-Konzentration. Durch entsprechende Zugabe von Wasser wurde die DNA-Konzentration auf 50 ng/µl eingestellt.

## **2.5 AFLP-Marker Entwicklung**

Für die Genotypisierung der Kreuzungen und der Kreuzungseltern in den Populationen wurde die AFLP-Technik (Vos et al., 1995; Schmolke, 2004) durchgeführt.

Die Restriktion und Ligation setzte sich wie in Tabelle 7 beschrieben zusammen.

Tab. 7: Mastermix für den Restriktions- und Ligationsansatz

Komponenten	Volumen in $\mu\text{l}$	Endkonzentration
ATP	1,25	1 mM
NEB2 Puffer 10x	1,25	1 mM
Ligase	0,17	1 U
BSA 10x	1,25	1 x
Sse 8387 I bzw. Pst I	0,125	2,5 U
Mse I	0,1	1 U
Mse-Adapter	0,5	2 $\mu\text{M}$
Sse-Adapter	0,5	0,2 $\mu\text{M}$
DNA	5,5	22 ng/ $\mu\text{l}$
Wasser <small>bidest</small>	1	
Gesamtvolumen	12,5	

Der Restriktion-Ligation-Ansatz wurde 2 h im Thermocycler bei 37°C inkubiert. Danach folgten die Preamplifikation (Tabelle 8 und 9) und anschließend die selektive PCR (Tabelle 10 und 11).

Tab. 8: Mastermix für die Preamplifikation

Komponenten	Volumen in $\mu\text{l}$	Endkonzentration
PCR Puffer 10x	1	1x
dNTP	0,4	0,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,3	1,5 mM
Sse 00 Primer	0,3	0,3 $\mu\text{M}$
Mse 00 Primer (für Sse) oder Mse 02 Primer (für Pst)	0,3	0,3 $\mu\text{M}$
Taq-Polymerase	0,1	1U/ $\mu\text{l}$
DNA aus Restriktion/Ligation (1:4 verdünnt)	3	
Wasser <small>bidest</small>	4,65	
Gesamtvolumen	10	

Tab. 9: Temperatur-/Zeitprofil für die Preamplifikation

Temperatur	Dauer	Zyklen
94°C	2 min	
94°C	30 sec	20x
60°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	

Tab. 10: Mastermix für die selektive PCR

Komponenten	Volumen in $\mu\text{l}$	Endkonzentration
PCR Puffer 10x	1	1x
dNTP	0,4	0,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,3	1,5 mM
Sse- bzw. Pst-Primer (10 mM)	0,3	0,3 $\mu\text{M}$
Mse 00 Primer (für Sse)	0,3	0,3 $\mu\text{M}$
Taq-Polymerase	0,05	0,5 U/ $\mu\text{l}$
DNA aus Preamplifikation (1:39 verdünnt)	3	
Wasser <sub>bidest</sub>	4,65	
Gesamtvolumen	10	

Tab. 11: Temperatur-/Zeitprofil für die selektive Amplifikation

Temperatur	Ramp	Dauer	Zyklen
94°C		2 min	
94°C	-1°C/sec	30 sec	9x
65°C	+1°C/sec	30 sec	
72°C		2 min	
94°C	-1°C/sec	30 sec	23x
56°C	+1°C/sec	90 sec	
72°C		2 min	
72°C		10 min	

## 2.6 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Amplifikate im elektrischen Feld fand bei AFLP- und Mikrosatellitenanalysen in einem 6 % denaturierendem Polyacrylamidgel bei 50 W statt. Alle SSE- bzw. MSE-Primer sowie ein Teil der Mikrosatellitenprimer waren mit dem Farbstoff Cy3 markiert. Bei Amplifikaten ohne Cy3 markierten Primern wurde nach der Elektrophorese auf die Polyacrylamidgele 8 ml 0,04 % Vistragreen gegossen und vorsichtig mit einem elastischen Plastikschaaber verteilt.

1,7 %-ige Agarosegele mit 0,005 % Ethidiumbromid wurden zur Auswertung von PCR-Reaktionen mit STS-Markern sowie zur Kontrolle von Restriktionsfragmenten verwendet. Die Elektrophorese fand bei 2 V/cm für 2 h statt. Die anschließende Visualisierung der Fragmente wurde mit einem Laserscanner durchgeführt.

## 2.7 Strategien der Markerentwicklung

Je nach Spaltung und Ausprägung der phänotypischen Ergebnisse wurden verschiedene Kartierungsstrategien angewandt (Tabelle 12).

Bei klarer Klassenbildung wurde die Strategie der „bulked segregant-Analyse“ eingesetzt. In der Population Classic/G93012 wurde die Identifizierung von gekoppelten Markern über die Genotypisierung der anfälligen beziehungsweise weniger befallenen Subpopulationen durchgeführt. Dazu wurden je 20 Linien der Ränder der Boniturverteilung verwendet. Aufgrund der kaum verbesserten Effektivität wurde für die Population Convent/92422 und Dekan/90018 jeweils die gesamte Population untersucht. Die Kartierung und Verifizierung der Marker wurde mit allen Individuen der Populationen durchgeführt. Die Schätzung der Effekte einzelner Gene fand über eine QTL-Analyse mittels spezieller Intervallkartierungsverfahren oder über lineare Regressionsmodelle statt. Populationen, die bei der Phänotypisierung eine breite kontinuierliche Verteilung der Resistenzausprägung zeigten, wurden komplett molekulargenetisch genotypisiert.

Als Markersystem wurden AFLP-Marker eingesetzt.

Tab. 12: Angewandte Strategien zur Entwicklung molekularer Marker

<b>Strategie</b> <b>Kreuzung</b>	<b>„bulked segregant“ Analyse</b>	<b>Kartierung mit extremen Linien</b>	<b>Kartierung mit gesamten Population</b>
Atlantis/Cortez	+	-	-
Dobros/Kalistos	+	-	-
Convent/92422	-	-	+
Classic/G93012	-	+	-
Dekan/90018	-	-	+
K2/Audace//Audace	+	-	-

## 2.8 Lokalisierung der Marker

Für die Lokalisierung der Marker wurden zum einen nullitetrasome Linien der Sorte Chinese Spring (zur Verfügung gestellt von Prof. Zeller, TU-München) sowie Mikrosatelliten- bzw. AFLP-Marker benutzt. Dabei wurden AFLP-Marker von Chinese Spring verwendet, welche in der Kreuzungspopulation mit dem Resistenzort koppelten. Fehlte ein Marker ausschließlich auf einer nullitetrasomen Linie, so konnte der Marker diesem entsprechenden fehlenden Chromosom der Linie zugeordnet werden. Als Weiteres wurde versucht mit Hilfe von Kopplungsanalysen mit Mikrosatelliten, deren Lage auf dem Weizengenom bekannt ist, die Marker zu lokalisieren. Dabei wurde für die verwendeten Mikrosatelliten folgendes PCR-Protokoll angewendet (Tabelle 13 und 14).

Tab. 13: PCR-Ansatz für die Amplifikation mit Mikrosatelliten

Komponenten	Volumen in $\mu\text{l}$	Endkonzentration
PCR Puffer 10x	2	1x
dNTP	0,8	0,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,6	2,5 mM
Primer F	2	0,3 $\mu\text{M}$
Primer R	2	0,3 $\mu\text{M}$
Taq-Polymerase	0,1	0,025U/ $\mu\text{l}$
DNA	1	2,5 ng/ $\mu\text{l}$
Wasser <small>bidest</small>	11,5	
Gesamtvolumen	20	

Tab. 14: Temperaturprofil bei Amplifikation mit Mikrosatelliten

Temperatur	Dauer	Zyklen
94°C	3 min	
94°C	10 sec	30x
50°C, 55°C, 60°C *	30 sec	
72°C	50 sec	
72°C	15 min	

\* : Je nach Literaturangabe

## 2.9 Charakterisierung der QTL

Die Ermittlung der Wirkung einzelner QTL erfolgte durch Mittelwertsvergleiche. Bei Normalverteilung der Boniturwerte (Classic/G93012, Dekan/90018, K2/Audace//Audace) erfolgte der statistische Test auf Signifikanz des Mittelwertsvergleichs nach Scheffe mit Hilfe des Statistikprogramms SAS. Bei nicht normalverteilten Boniturnoten, wie bei den Nachkommenschaften der Kreuzungen Atlantis/Cortez, Dobros/Kalistos und Convent/92422 fand der Wilcoxon-Rangsummentest im Statistikprogramm R (Version 2.8.0) Anwendung (Befehl: `wilcox.test`). Von einem signifikanten Einfluss der QTL auf die Resistenzausprägung ging man bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 5 % aus.

Zur Berechnung der genetischen Abstände zwischen zwei Markern wurde das Programm Mapmaker (Lander et al., 1987) hinzugezogen. Dabei wurde bei einem LOD-Wert  $>3$  von einer Kopplung der Marker zueinander ausgegangen. Bei mehreren Markern wurde zum Kartieren das Programm Joinmap (Ooijen und Voorrips, 2001) benutzt. Die Lokalisierung der QTL bei Vorliegen von Kopplungsgruppen erfolgte mit dem Program MultiQTL. Dabei wurden für die über die Transformation die genetischen Abstände der Logarithmus nach Kosambi (1944) errechnet.

## 2.10 STS- und Pyrosequencing Marker

Zur Entwicklung eines neuen STS- und Pyrosequencing Markers für *Pm29* wurde ein Amplifikat aus dem AFLP-Fragment sequenziert.

*Pm29* Caps Forward: 5' Biotin-ctg gac gga tga ggg cat- 3'

*Pm29* Caps Reverse: 5'-gtc gaa atc aga aaa gtc t-3'

Der Reaktionsmix hatte dabei folgende Zusammensetzung:

Tab. 15: PCR-Ansatz zur Amplifizierung des zu sequenzierenden Fragments

Komponenten	Volumen in $\mu\text{l}$	Endkonzentration
PCR Puffer 10x	2,5	1x
dNTP	0,8	0,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	2,5	2,5 mM
Primer F	1	0,4 $\mu\text{M}$
Primer R	1	0,4 $\mu\text{M}$
Taq-Polymerase	0,2	0,04 U/ $\mu\text{l}$
DNA	1	2 ng/ $\mu\text{l}$
Wasser bidest	16	
Gesamtvolumen	25	

Tab. 16: Temperaturprofil zur Amplifikation eines *Pm29*-Markers

Temperatur	Dauer	Zyklen
94°C	2 min	39x
94°C	30 sec	
60°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	

Das gewonnene PCR-Produkt (Tabelle 15 und 16) wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Daraufhin wurden die Amplifikate ausgeschnitten und in 20 µl Wasser eluiert.

Anschließend erfolgte die Reamplifikation nach dem gleichen PCR-Protokoll.

Zur Kontrolle der Spezifität der PCR erfolgte eine Gelelektrophese in einem 1,7 % Agarosegel mit 10 µl des PCR-Produkts. Der verbleibende Rest des PCR-Produkts wurde mit dem Qiagen Purification Kit nach Empfehlung des Herstellers von dNTPs, Primern, Salzen und unerwünschten kurzkettigen Amplifikaten gereinigt.

Die erhaltenen Fragmente wurden mit Hilfe des Qiagen Cloning Kit kloniert. Pro Probe wurden gekühlt 1 µl pDrive Cloning Vektor (50 ng/µl) mit 2 µl PCR Produkt, 2 µl Wasser, sowie 5 µl 2 x Ligation Mastermix miteinander vermischt. Nach 30 min Inkubationszeit der Vektoren bei 4°C wurden die kompetenten Zellen (Qiagen) eisgekühlt aufgetaut. Danach erfolgte die Zugabe von 2 µl der Ligation zu den Zellen mit anschließender Inkubation von 5 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen für 30 sec bei 42°C und daraufhin wiederum für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Hinzugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Zellen sofort auf LB Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 36°C im Brutschrank gelagert.

Mit autoklavierten Zahnstochern wurden die weißen Kolonien gepickt und in flüssiges LB-Medium gegeben. Daraufhin fand die Inkubation für 24 h bei 36°C im Brutschrank statt. Die Miniprep erfolgte mit dem Nucleospin® Plasmid Aufreinigungs-Kit der Firma Macherey-Nagel. Zur Kontrolle des Inserts wurden 4 µl pDNA mit dem Enzym EcoRI versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmide.

Zum schnellen Nachweis von SNPs in der Sequenz wurde die Methode des Pyrosequencings eingesetzt. Die Detektion von SNPs mit dem Pyrosequencer basierte auf den Daten der Sequenzierungen der Firma MediGenomix. Hierfür wurden für die PCR die Primerpaare *Pm29*

---

CAPS Forward/*Pm29* CAPS Reverse (biotinyliert) eingesetzt. Danach folgte eine Zugabe von 20  $\mu$ l PCR-Produkt, das mit 20  $\mu$ l Wasser verdünnt war. Anschließend wurden 40  $\mu$ l Beads-Binding-Puffer (3  $\mu$ l Sepharose-Beads mit 37  $\mu$ l Binding-Puffer) gut gemischt. Die Sepharose-Beads wurden mit der daran gebundenen DNA mit dem Vacuum-Prep-Tool (VPT) unter angelegtem Vakuum angesaugt. Danach wurden das PCR-Produkt mit dem VPT für 5 sec in 70 % Ethanol gegeben. Daraufhin wurde mit dem VPT die DNA für 5 sec in eine denaturierende Lösung gegeben. Anschließend erfolgte für 5 sec eine Reinigung im Wasch-Puffer. Zum Ablösen der DNA wurde das Vakuum abgeschaltet und das VPT in 38,8  $\mu$ l Buffer und 1,2  $\mu$ l 10 mM Sequencing Primer leicht geschüttelt. Danach wurden die gelösten Proben 2 min auf 80°C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung und Phänotypisierung der Feldresistenz gegen den Echten Mehltau im Winterweizensortiment

##### 3.1.1 Sorten mit unbekanntem Resistenzgenen: Cortez

Die 91 doppelhaploiden Linien der Population Atlantis/Cortez wurden an vier Umwelten, welche einen unterschiedlichen Krankheitsdruck aufwiesen, geprüft (Abbildung 9).

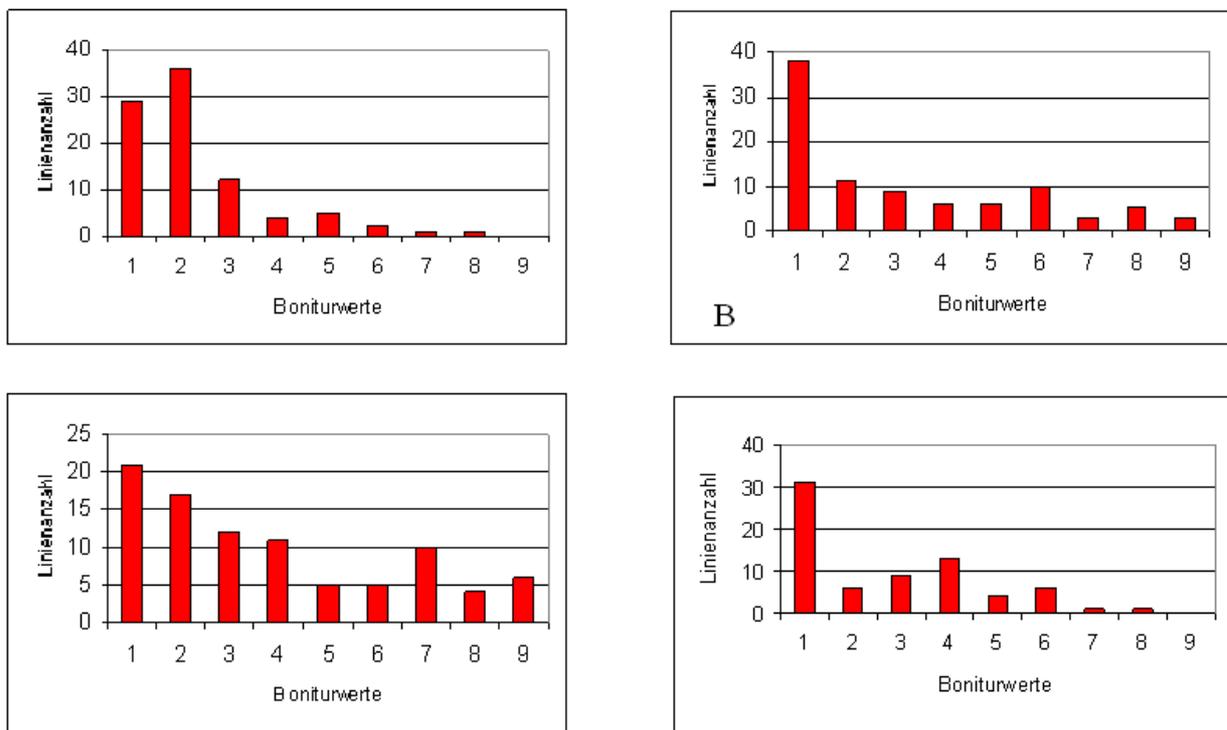


Abb. 9: Verteilung der Mehltau-Bonituren aus der Feldprüfung der DH-Population Atlantis/Cortez an den Standorten Pulling 2003 (A), Söllingen 2004 (B), Feldkirchen 2004 (C), Lengler 2009 (D).

Bei der Bonitur in Pulling 2003 konnte bei der Mehrzahl der Linien kein Befall festgestellt werden. Der mittlere Befall lag bei 2,0 bei einem Median von 1. Die Verteilung war linksschief. 49 Pflanzen hatten einen Befall von < 2,5, 42 Pflanzen waren stärker befallen. In Feldkirchen 2004 betrug der Boniturmittelwert der Population 2,0 bei einem Median von 1,6. 65 Linien hatten einen Boniturwert < 2,5. Die verbleibenden 25 Linien waren stärker infiziert. In Söllingen betrug der mittlere Befall im Jahr 2004 3,6 mit einem Median von 2,5. Hier hatten 38 Linien einen Befall < 2,5. 53 Pflanzen waren mit dem Boniturwert > 2,5 stärker anfällig gegenüber dem Mehltauerreger. Dabei wurde aufgrund der sehr linksschiefen Verteilung der Boniturdaten von

Tab. 17: Korrelationskoeffizient und p-Wert der Boniturnoten zwischen den einzelnen Umwelten

	Pulling 2003	Feldkirchen 2004	Söllingen 2004
Feldkirchen 2004	$r = 0,72$ $p < 0,01$		$r = 0,73$ $p < 0,01$
Söllingen 2004	$r = 0,70$ $p < 0,01$	$r = 0,73$ $p = <0,01$	
Lenglern 2009	$r = 0,65$ $p < 0,01$	$r = 0,74$ $p < 0,01$	$r = 0,83$ $p < 0,01$

Pulling 2003 für die Auswertung nur die Versuchsdaten aus Söllingen und Feldkirchen 2004, sowie Lenglern 2009 verwendet.

Zwischen den Umwelten Söllingen 2004 und Feldkirchen 2004 zeigte sich eine sehr gute Korrelation. Die weiteren Umwelten waren nicht miteinander signifikant korreliert (Tabelle 17).

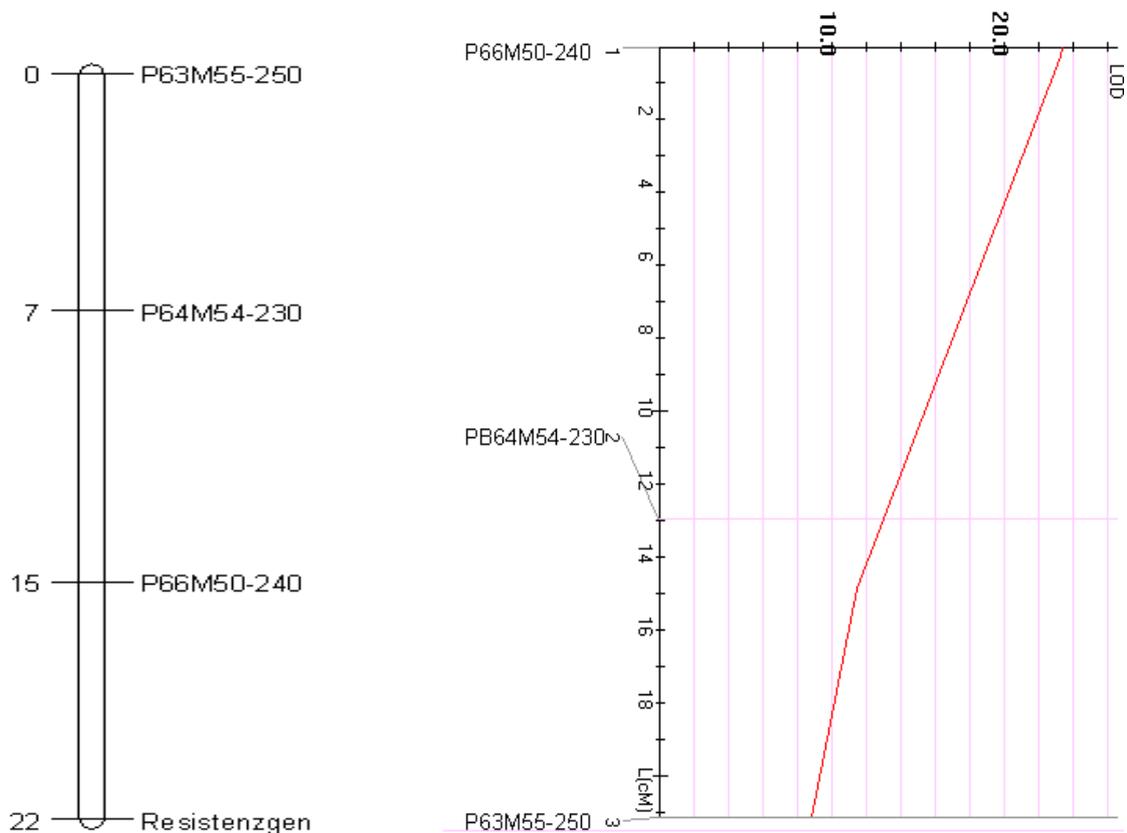


Abb. 10: Genetische Karte für den Mehлтаuresistenzgenort der Sorte Cortez basierend auf der Keimpflanzenprüfung (links) und LOD-Kurve der QTL-Kartierung (rechts). Dabei liegen die Feldbonituren von Söllingen und Feldkirchen aus dem Jahre 2004 sowie von Lenglern 2009 zu Grunde.

Basierend auf den Ergebnissen der Feldversuche wurde jeweils DNA resistenter und anfälliger Linien gemischt und mit 64 AFLP-Primerkombinationen auf Basis der „bulked segregant“-Analyse untersucht. Dabei wurden drei AFLP-Marker identifiziert, welche in einem genetischen Abstand von 7-22 cM zum Mehлтаuresistenzgenort liegen. Die QTL-Kartierung mit den Boniturdaten aus den Jahr 2004 in Feldkirchen und Söllingen sowie Lenglern 2009, die weniger linksschief verteilt waren, ergab die Positionierung eines Resistenz-QTLs in unmittelbarer Nähe zum AFLP-Markergenort XP66M50-240 (Abbildung 10). Dieser Genort erklärte 45 % der phänotypischen Varianz der Mehлтаubonitur in dieser Population unter Berücksichtigung der Umwelteffekte.

Dabei zeigten Linien mit dem Resistenzgenmarker P66M50-240 gegenüber denen ohne diesen Marker einen signifikant erniedrigten Mehлтаubefall (Abbildung 11).

Parallel zur Feldprüfung wurden die Elternlinien Atlantis und Cortez mit Einspor-Isolaten geprüft, um in der Population spaltende Keimlingsresistenzgene zu identifizieren. Dabei wurden, wie bei allen anderen verwendeten Populationen, mit den Kreuzungseltern Inokulationsversuche mit mehreren Einsporisolaten durchgeführt. Die dabei erhaltenen Infektionsmuster mit den möglicherweise enthaltenen Resistenzgenen sind im Anhang aufgelistet (7.1).

Die ausgewählten Mehлтаuisolate 23, 24, 42 und 146 zeigten sich alle bei der Sorte Atlantis virulent und bei Cortez avirulent (Tabelle 18). Diese Isolate sind gegenüber den in Atlantis enthaltenen Resistenzgenen *Pm4b* und *Pm8* ebenfalls virulent. Mit diesen differenzierenden Isolaten wurden anschließend Keimpflanzen der gesamten Population inokuliert und der Mehлтаubefall nach 10 Tagen bonitiert. Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte der Marker P66M50-240 mit einem Abstand von 7 cM zum Resistenzgen lokalisiert werden. Bei der Verrechnung der Feldboniturdaten konnte mit dem Marker P66M50-240 zum Resistenzgen ein Kopplungsabstand von 0,8 cM berechnet werden.

Aufgrund der Resistenz der Sorte Cortez gegen alle verwendeten Isolate, wurden zur weiteren genetischen Aufklärung Linien der Population mit Einzelsporen untersucht, die das festgestellte Hauptgen nicht enthielten. Dabei zeigten sich bei manchen Linien ohne Resistenzmarker Virulenzmuster, die der Kontrollsorte Rektor (*Pm5*) glichen. Durch Zuhilfenahme eines mit dem *Pm5*-Locus gekoppelten Mikrosatelliten XGWM1267 (Huang et al., 2003) konnte in der Subpopulation ohne den Resistenzgenmarker P66M50-40 eine Kopplung von 6 cM festgestellt

werden. Eine signifikante Wirkung von *Pm5* auf die Mehлтаuresistenz im Feld konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Tab. 18: Vergleich der Virulenzprofile von Linien mit und ohne XP66M50-240

Mehltauisolate	Feldresistente Linien <u>mit dem AFLP-</u> Fragment XP66M50-240			Feldresistente Linien <u>ohne dem AFLP-</u> Fragment XP66M50-240			Kontrollsorte Rektor (enthält <i>Pm5</i> )
	6004	6009	6011	6021	6037	6046	
23	0	0	1	2	2	2	2
24	0	0	0	4	4	4	4
28	0	0	0	4	4	-	4
42	0	0	0	2	2	2	2

Mit Hilfe des AFLP-Markers S17M20-133 konnte auch die Spaltung des in Atlantis vorhanden Mehлтаuresistenzgenes *Pm4b* bestimmt werden. Der Anteil der Linien mit dem Mehлтаuresistenzgenen *Pm4b* betrug etwa  $\frac{1}{4}$ , was auf Mischerbigkeit der Sorte Atlantis in Bezug auf *Pm4b* zurückzuführen ist (Anonym, 2003). Auch bei Berücksichtigung des Hauptresistenz-QTL mittels des AFLP-Markers P66M50-240 ergab sich kein signifikanter Befallsunterschied in der Subpopulation mit und ohne den *Pm4b*-Marker.

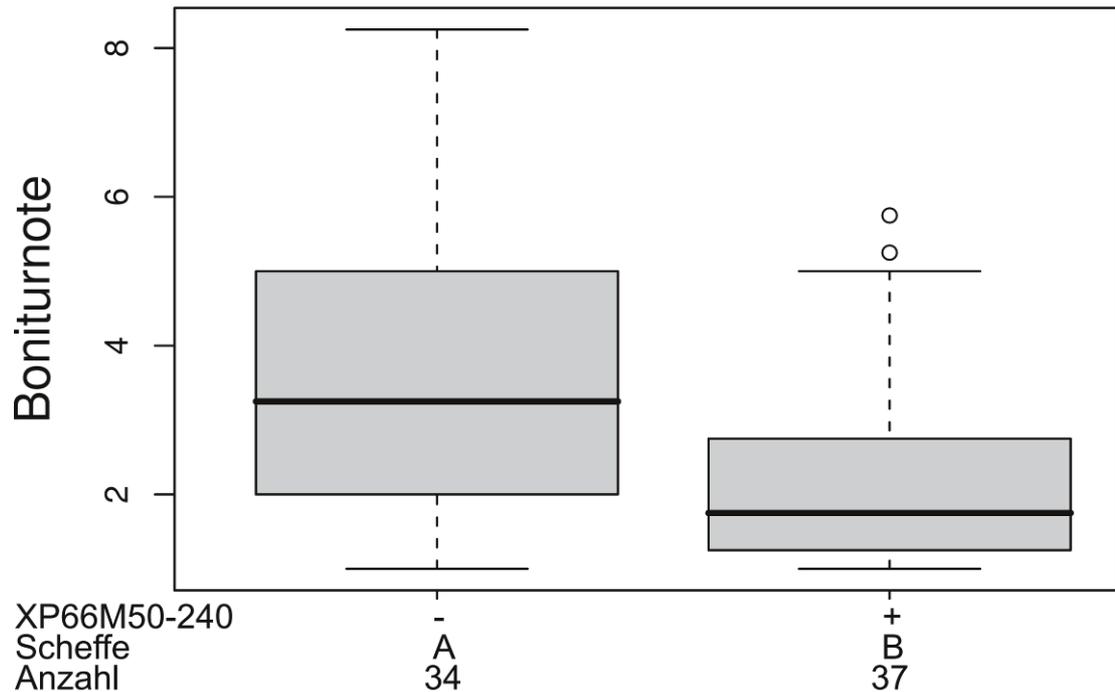


Abb. 11: Boxplot der Boniturmittelwerte (Feldkirchen 2004, Söllingen, 2004 und Lenglern 2009) von Linien der Kreuzung Atlantis/Cortez mit und ohne den Resistenzmarker P66M50-240.

### 3.1.2 Sorten mit unbekanntem Resistenzgenen: Dobros

Die 120 Linien der Population Dobros/Kalistos wurden in den Jahren 2003-2005 in insgesamt 5 Umwelten auf ihre Mehlttauresistenz geprüft. Da in Feldkirchen und Söllingen 2003 aufgrund der starken Auswinterung und Hitze nur noch ein Teil der Linien vorhanden war, welche kaum Befall zeigten, wurden die dazugehörigen Boniturdaten nicht weiter berücksichtigt. In den restlichen Umwelten konnte eine linksschiefe Verteilung beobachtet werden, die auf mehrere wirksame Resistenzgene schließen lässt (Abbildung 12). Im Mittel wurde nahezu  $\frac{3}{4}$  der Linien mit einer durchschnittlichen Boniturnote kleiner zwei beurteilt, was einer Spaltung von zwei dominanten Genen der Selbstungsnachkommen entsprechen könnte. Die Befallsverteilung variierte mit Ausnahme dem Jahr 2003 in Feldkirchen zwischen den Umwelten kaum, was sich in den relativ niedrigen Standardabweichungen in der Befallsverteilung sowie der ansonsten hohen Korrelationen der Boniturnote zeigt (Tabelle 19).

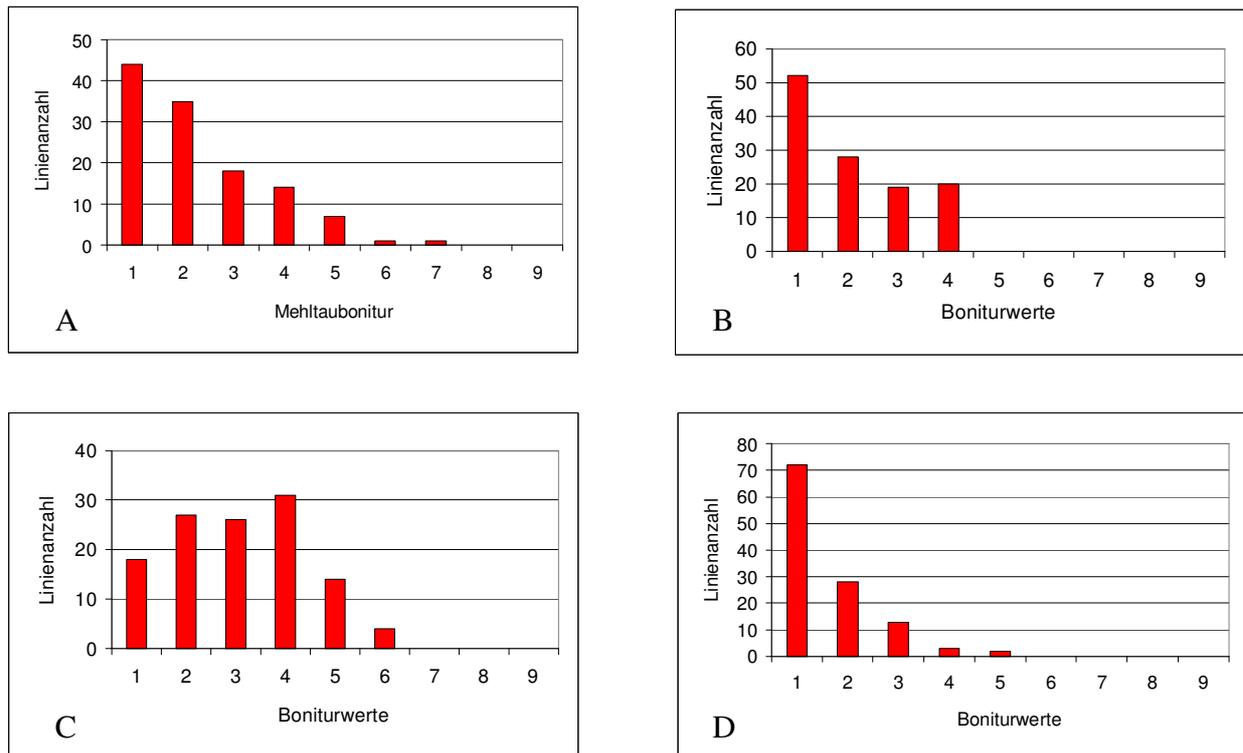


Abb. 12: Verteilung der Mehltau-Bonituren aus der Feldprüfung der Population Dobros/Kalistos an den Standorten Sölingen 2004 (A), Feldkirchen 2004 (B), Sölingen 2005 (C) und Feldkirchen 2005 (D)

Tab. 19: Korrelationskoeffizient und p-Wert zwischen den einzelnen Boniturnoten der Umwelten in der Population Dobros/Kalistos

	Sölingen 2004	Feldkirchen 2004	Feldkirchen 2005
Sölingen 2005	r = 0,14 p = 0,23	r = 0,03 p = 0,91	r = 0,03 p = 0,94
Feldkirchen 2004	r = 0,45 p < 0,01		
Feldkirchen 2005	r = 0,44 p = 0,14	r = 0,03 p = 0,91	

Bei der Prüfung der Keimlingsresistenzen mit Einsporisolen ergab sich für Kalistos ein Resistenzmuster, das dem der Sommerweizensorte Ralle mit dem Resistenzgen *Pm3* sehr stark ähnelt (7.1). Für die Resistenz der Sorte Dobros konnte keine Zuordnung zu bekannten Resistenzgenen getroffen werden.

Für die molekulargenetische Identifizierung wurde die „bulk segregant“-Methode basierend auf den Feldbonituren angewandt. Hierfür wurden Pools mit 8-10 resistenten sowie mit 8-10

anfälligen Linien erstellt. Dabei konnten die Marker P66M60-260 und P67M56-230 für zwei unabhängig spaltende QTLs gefunden werden, die jeweils 5 % bzw. 6 % der phänotypischen Varianz über die Mittelwerte erklären. Beide Marker zusammen erklären bei Berücksichtigung der Umwelteffekte 20 % der phänotypischen Varianz. Das Resistenzniveau von Linien ohne diese beiden Resistenz-QTLs ist immer noch sehr hoch (Abbildung 13). Nur die Genotypenklasse mit beiden QTLs lässt sich signifikant von der Klasse, die beide QTLs nicht besitzt, abgrenzen.

Nach Infektionsversuchen der Keimpflanzen (Tabelle 20) mit den Einsporisolen 20 und 44, welche gleiche Virulenzen zeigten, konnte für P67M56-230 ein genetischer Abstand von 14 cM (LOD 8,7) zum Resistenzgen ermittelt werden. Eine Lokalisierung der Resistenzloci mit Hilfe nullitetrasomer Linien sowie vorhandener genetischer AFLP-Karten (Häberle, 2008; Häberle et al., 2009; Holzapfel et al., 2008; Holzapfel, 2009) gelang nicht. Die Ursache dafür lag darin, dass die beiden Marker P66M60-260 und P67M56-230 weder in Chinese Spring, dem Donor der nullitetrasomen Linien, noch in den Eltern der verschiedenen Kartierungspopulationen amplifiziert wurden.

Tab. 20: Ergebnis des Inokulationversuchs der Nachkommenschaften der Kreuzung Dobros/Kalistos mit den Isolaten 44 und 20

		Isolatreaktion	
		kompatibel	inkompatibel
<b>Marker</b>	P67M56-230 vorhanden	7	56
	P67M56-230 <u>nicht</u> vorhanden	57	6

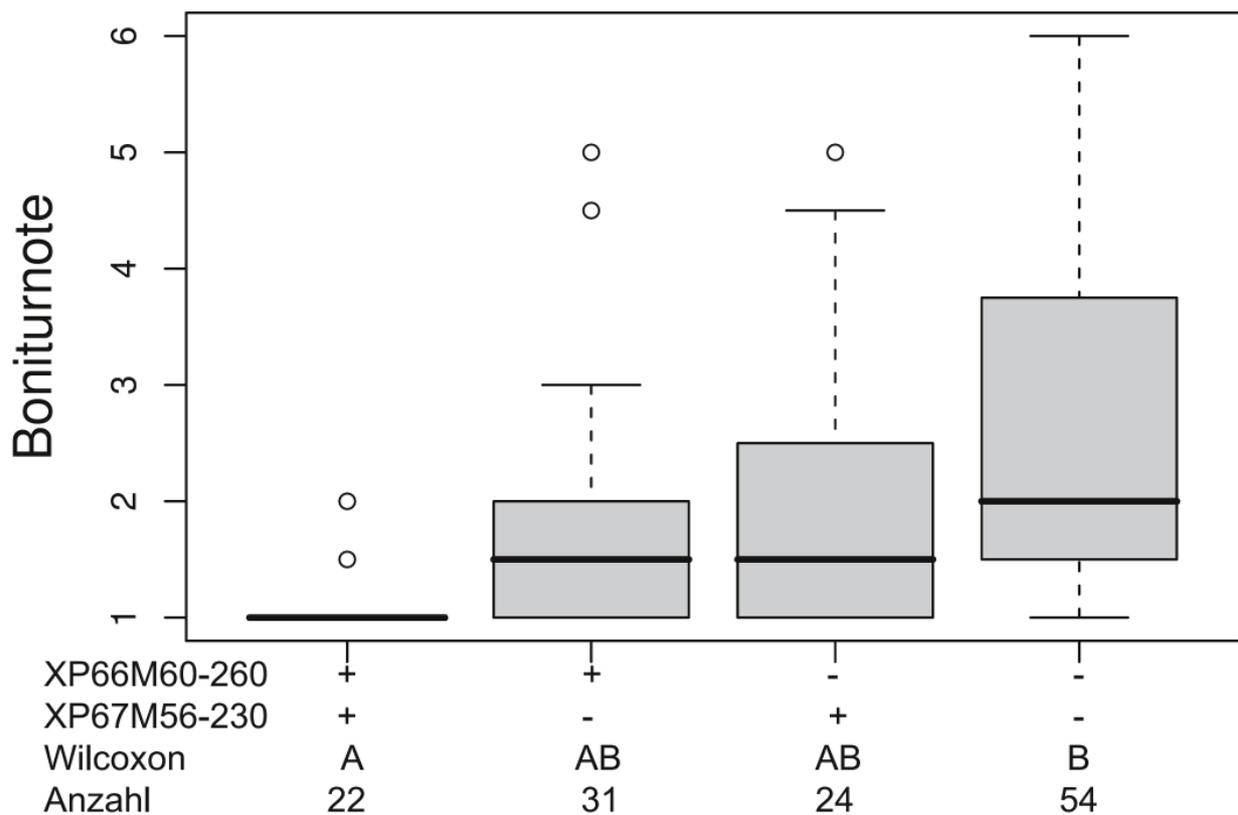


Abb. 13: Boniturverteilung der Linien aus der Kreuzung Dobros/Kalistos in den Subpopulationen klassifiziert mit den Markern P66M60-260 und P67M56-230

### 3.1.3 Sorten mit unbekanntem Resistenzgenen: Classic

In der Population Classic/G93012 waren die Boniturnoten der Linien in den 5 Prüfumwelten normal verteilt. Die meisten Linien hatten dabei im Durchschnitt einen Befall zwischen 2,5 und 3,5. Der Median betrug 3,1. Im Mittel wurden die Linien mit der Boniturnote 3,2 bewertet (Abbildung 14). Die Korrelation der Boniturnoten zwischen den Umwelten lag dabei im mittleren Bereich (Tabelle 21).

Für die QTL-Analyse wurden jeweils 20 Linien des rechten bzw. linken Randes der Verteilung mit 80 AFLP-Primerkombinationen untersucht. Der Marker P65M60-700 erklärte 17 % der phänotypischen Varianz über die Population.

Die Untersuchung der Keimpflanzen ergab für Classic eine mögliche Resistenzgenkombination von *Pm2*, *Pm4b* und *Pm5* (7.1). Deshalb wurde die Population mit Markern, die in enger Beziehung zu den bekannten Resistenzgenen *Pm2*, *Pm4b* und *Pm5* stehen, untersucht. Dabei

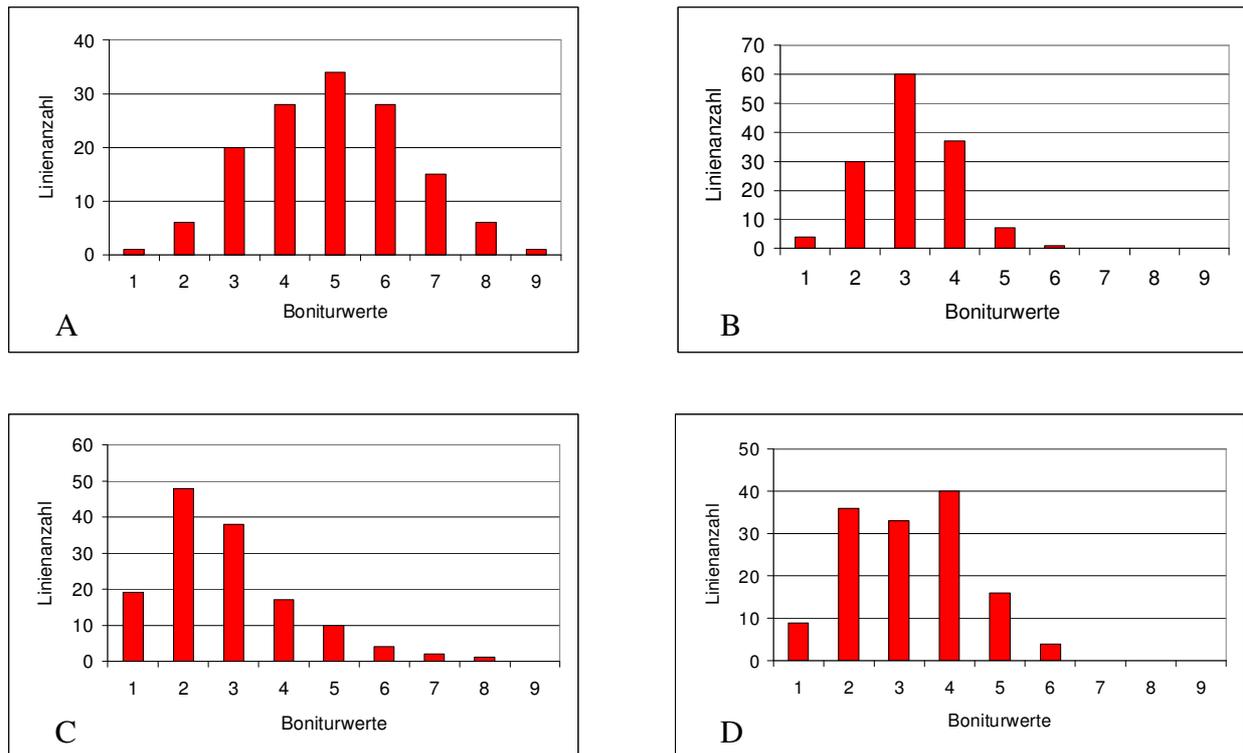


Abb. 14: Verteilung der Mehltau-Bonituren aus der Feldprüfung der Population G93012/Classic an den Standorten Söllingen 2003 (A), Feldkirchen 2003 (B), Söllingen 2004 (C), Feldkirchen 2004 (D).

wurde der Mikrosatellitenmarker GWM205, der auf dem Chromosomenarm 5DS in der Nähe der *Pm2* Mehltaresistenz lokalisiert ist, in einem Abstand von 20 cM zum Resistenzmarkergenort XP65M60-700 berechnet (Abbildung 16). Die Anwesenheit von *Pm4b* konnte durch den AFLP-Marker S17M20-133 nicht bestätigt werden.

Tab. 21: Korrelationskoeffizienten und p-Werte zwischen den einzelnen Boniturnoten der Umwelten in der Population G93012/Classic

	Feldkirchen 2003	Feldkirchen 2004	Söllingen 2003
Feldkirchen 2004	$r < 0,01$ $p = 0,25$		$r < 0,01$ $p = 0,33$
Söllingen 2003	$r < 0,01$ $p = 0,51$	$r < 0,01$ $p = 0,33$	
Söllingen 2004	$r < 0,01$ $p = 0,46$	$r < 0,01$ $p = 0,35$	$r < 0,01$ $p = 0,42$

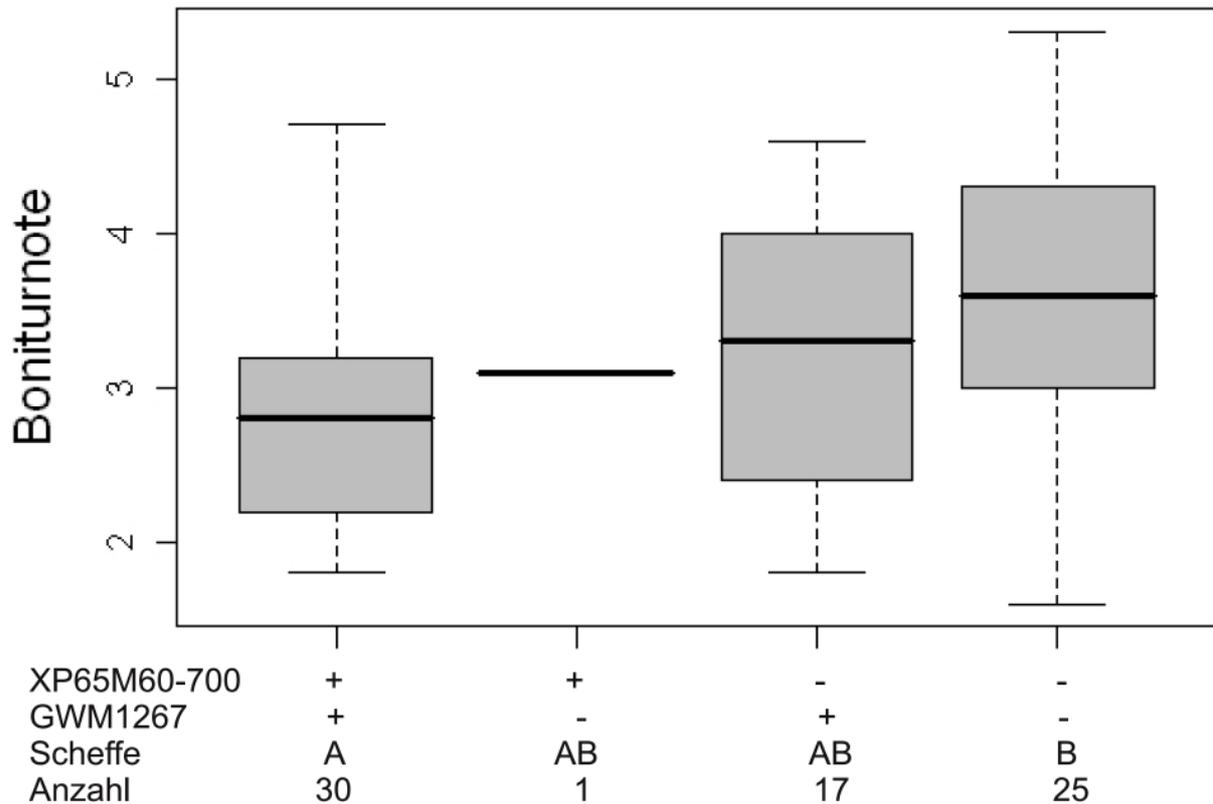


Abb. 15: Boniturverteilung der Linien in den Subpopulationen klassifiziert mit den Markern P65M60-700 und GWM1267.

Der Markergenort XGWM1267 ist in der Nähe von *Pm5* auf dem Chromosomenarm 7BL lokalisiert. Er wurde als Kandidatenmarker geprüft und erklärte 35 % der phänotypischen Varianz bei Berücksichtigung der Umwelteffekte (Abbildung 15).

Zwischen den Subpopulationen lassen sich nur die Gruppen signifikant unterscheiden, welche beide Resistenzgenorte besitzen oder keinen der beiden haben. Dabei entsprach die Spaltung des Markers GWM1267 für *Pm5* mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von <5 % nicht einer erwarteten 1:1 Spaltung.

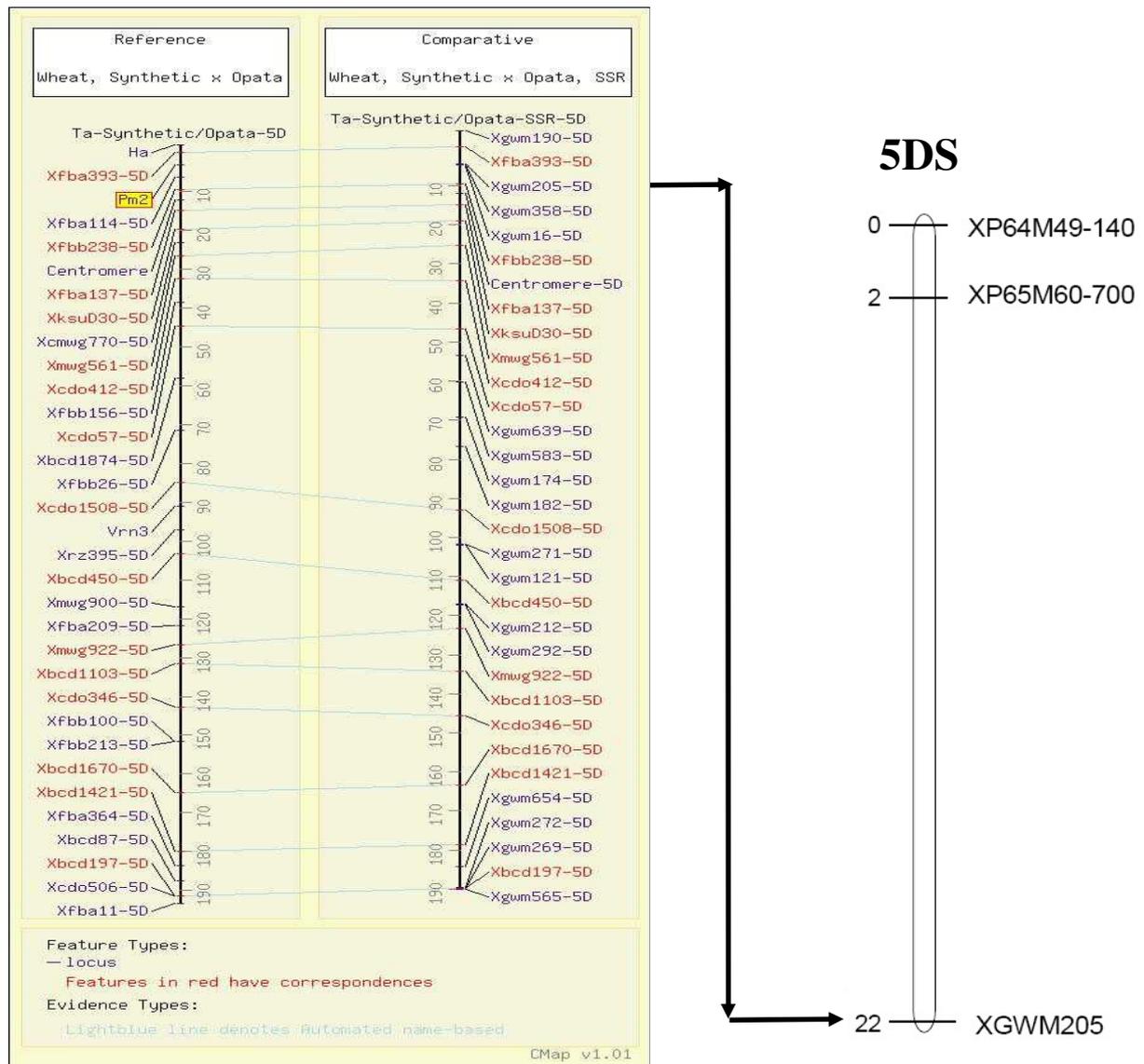


Abb. 16: Kartierung der AFLP-Marker auf Chromosom 5DS (GrainGenes, Stand 2010) bei der Kreuzung G93012/Classic. Die tatsächliche Ausrichtung der genetischen Karten zueinander ist unklar.

### 3.1.4 Resistente Sorten mit bekannten Resistenzgenen: Dekan

Bedingt durch die Auswinterung im Jahr 2003 wurden nur die Ergebnisse der 3 Umwelten aus den Jahren 2004 und 2005 in die Auswertung einbezogen. Das Befallsmaximum der infizierten Linien lag dabei im Durchschnitt zwischen 2,5 und 3,5. Der Median betrug im Durchschnitt aller Orte 3,1, der Mittelwert war 3,2. Dabei zeigten sich normalverteilte Bonituren für die Linien der Population 90018/Dekan mit einem insgesamt guten Resistenzniveau (Abbildung 17). Der Anteil der Linien (2004 und 2005) mit Boniturwerten < 2,5 betrug 62 %. Die Korrelation der Bonituren

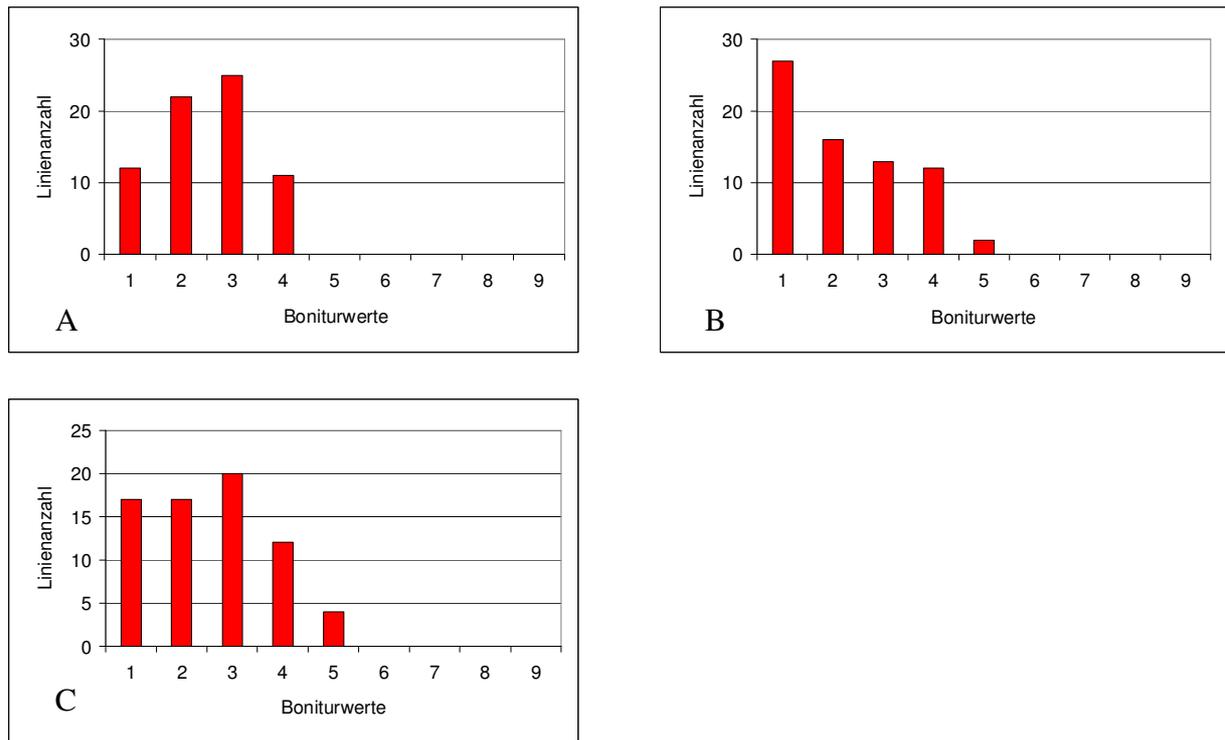


Abb. 17: Verteilung der Mehltau-Bonituren aus der Feldprüfung der Population Dekan/90018 an den Standorten Feldkirchen 2004 (A), Söllingen 2004 (B), Feldkirchen 2005 (C).

zwischen den einzelnen Umwelten war dabei durchgehend signifikant (Tabelle 22). Aufgrund der begrenzten Populationsgröße und der geringen Anzahl extrem reagierender Linien wurde die komplette Population mit 64 AFLP-Primerkombinationen genotypisiert.

Tab. 22: p-Wert und Korrelationskoeffizient der Boniturnoten zwischen den Umwelten in der Population Dekan/90018

	Feldkirchen 2004	Feldkirchen 2005
Feldkirchen 2005	r = 0,26 p = 0,02	
Söllingen 2004	r = 0,54 p < 0,01	r = 0,30 p < 0,01

Mittels eines linearen Modells wurde der AFLP-Marker P63M52-310 für ein unbekanntes Resistenzgen identifiziert, der allein 18 % der phänotypischen Varianz unter Berücksichtigung der Umwelteffekte erklärt und damit sehr wesentlich zur Resistenz beiträgt. Eine Lokalisierung mit Hilfe der nullitrasomen Linien oder über einen Vergleich mit den anderen vorhandenen Weizenarten war nicht möglich.

Da sich in der Sorte Dekan auch die qualitativ wirkenden Resistenzgene *Pm4b*, *Pm5* und *Pm6* mittels der Wirt-Pathogen-Interaktion im Keimpflanzenstadium diagnostizieren ließen (7.1), wurden molekulare Marker zur Bestimmung der Spaltung auf genotypischem Niveau verwendet. Dabei zeigte die Spaltung des für *Pm6* diagnostischen AFLP-Markers S13M20-120 (Hartl mündlich) keinen Zusammenhang mit den Feldbonituren. *Pm5* ist in beiden Kreuzungseltern vorhanden, so dass keine Spaltung zu erwarten ist. Die Spaltung des mit dem *Pm5*-Genort eng gekoppelten Mikrosatelliten GWM577 zeigte keine Beziehung zur Resistenzausprägung. Dagegen erklärte der AFLP-Marker S17M20-133, der für *Pm4a/Pm4b* diagnostisch ist, 14 % der phänotypischen Varianz in der Subpopulation der 25 Linien ohne den mit Mehltresistenz assoziierten Markerlocus XP63M52-310.

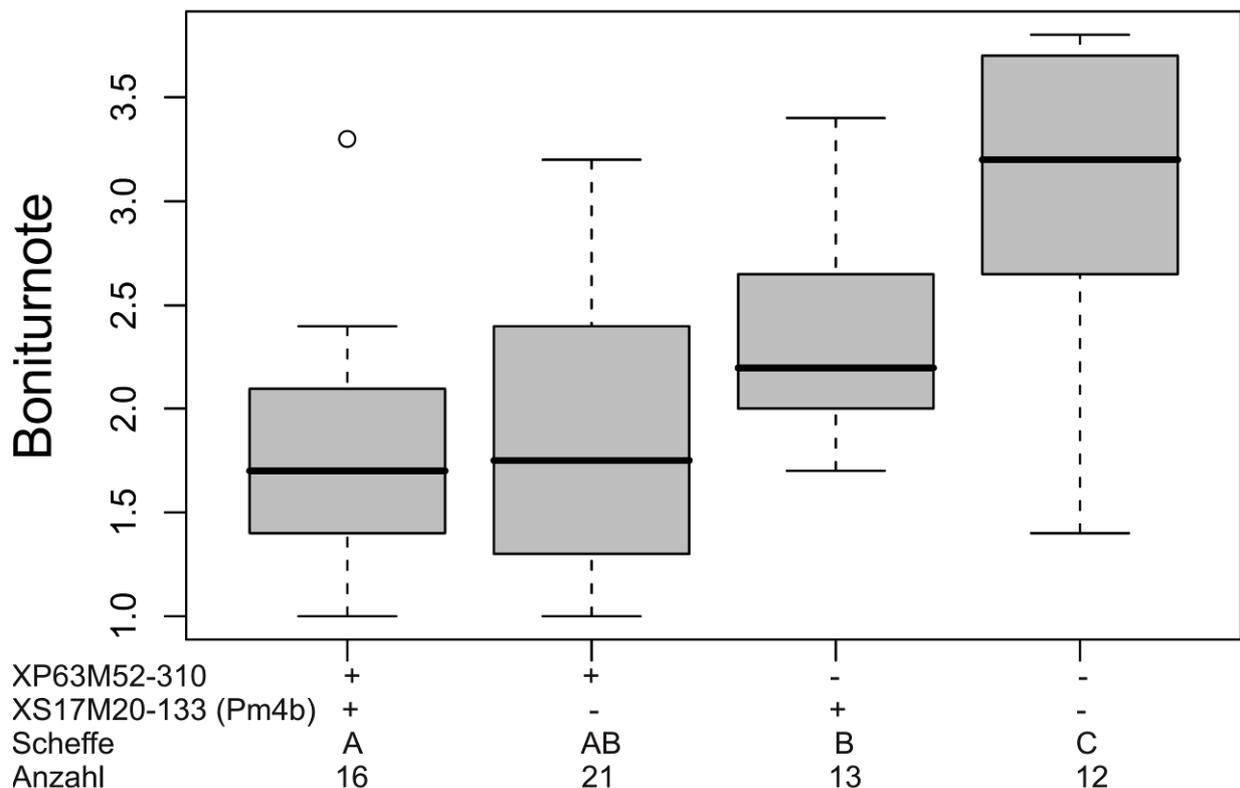


Abb. 18: Boniturverteilung der Linien aus der Kreuzung Dekan/90018 in den Subpopulationen klassifiziert mit den Markern P63M52-310 und S17M20-133 (*Pm4*-Locus).

Die Regression der Gesamtpopulation mit beiden QTLs und deren Wechselwirkung erklärt 32 % der phänotypischen Varianz im Feldbestand. Die positive Reaktion der Resistenzgene ist deutlich als Differenzierung zwischen den Genotypenklassen zu beobachten, wobei der QTL am *Pm4*-Locus zusammen mit dem QTL (XP63M52-310) keine zusätzliche Verbesserung der Resistenz bewirkte (Abbildung 18).

### 3.1.5 Resistente Sorten mit bekannten Resistenzgenen: Convent

Die Spaltung in der Population Convent/92422 ergab abgesehen von dem sehr trockenen und heißen Jahr 2003, in dem in Feldkirchen kaum mehltaubefallene Linien zu beobachten waren, eine breite Verteilung der Linienbonituren (Abbildung 19).

Bei der Kreuzung Convent/92422 konnte zwischen 2003 und 2004 ein mittlerer Befall von 2,4 festgestellt werden. Der Median lag dabei bei 2,3. 60 % der Linien waren besser als 2,5. Zwei Linien waren mit den Boniturwerten 4,5-5,5 am meisten befallen. Nur ein geringer Anteil der Linien war sehr resistent und mit der Note 1 bonitiert. Die Korrelation der Boniturwerte zwischen den einzelnen Umwelten war dabei zum Teil gering (Tabelle 23).

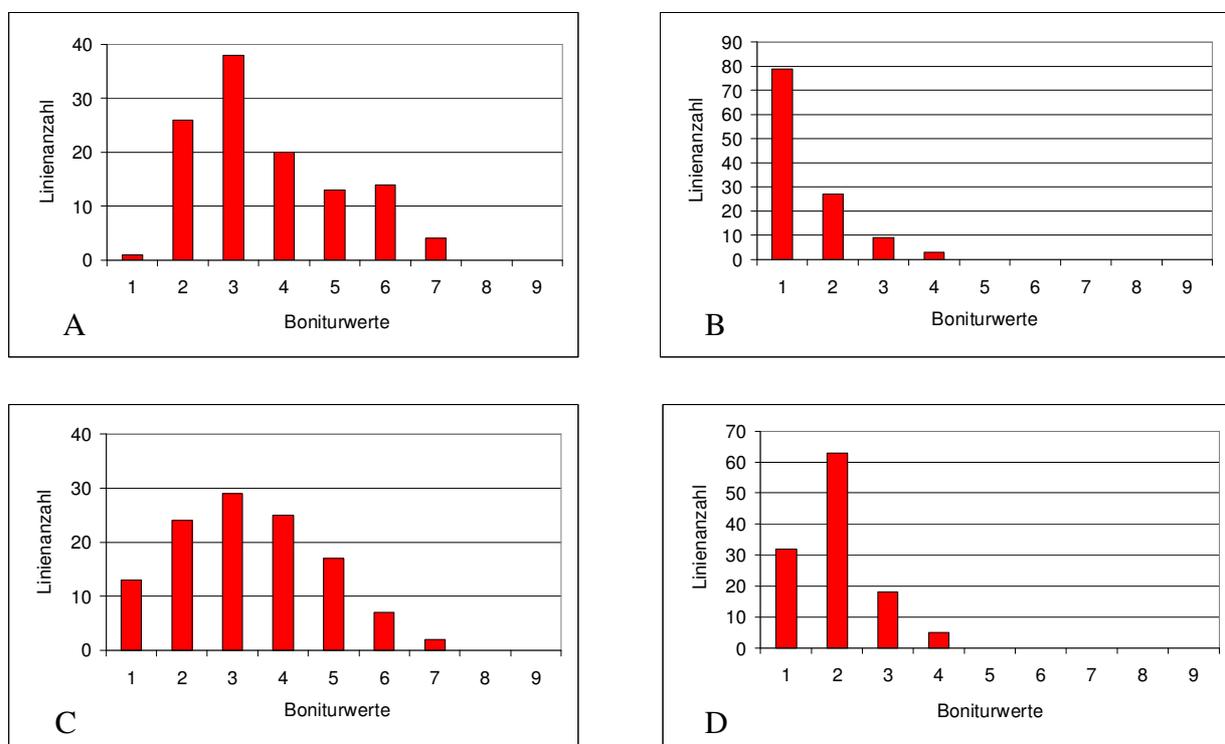


Abb. 19: Verteilung der Mehltau-Bonituren aus der Feldprüfung der Population Convent/92422 an den Standorten Söllingen 2003 (A), Feldkirchen 2003 (B), Söllingen 2004 (C), Feldkirchen 2004 (D).

Basierend auf den Ergebnissen des Blattsegmenttests war die Spaltung der Resistenzgene *Pm4b* und *Pm6* zu erwarten. *Pm5* könnte in beiden Eltern vorhanden sein. Beide zuvor schon beschriebene AFLP-Marker für *Pm4b* und *Pm6* spalteten in der Nachkommenschaft, zeigten aber keinen signifikanten Zusammenhang mit der Mehltaresistenz.

Tab.23: Korrelationskoeffizient und p-Wert der Boniturnoten zwischen den Umwelten in der Population Convent/92422

	Feldkirchen 2003	Feldkirchen 2004	Söllingen 2003
Feldkirchen 2004	r = 0,13 p = 0,15		r = 0,22 p = 0,01
Söllingen 2003	r = 0,37 p < 0,01	r = 0,22 p < 0,01	
Söllingen 2004	r = 0,25 p < 0,01	r = 0,14 p = 0,10	r = 0,54 p < 0,01

Zur molekulargenetischen Identifizierung der für die Mehltaresistenz verantwortlichen Gene wurden jeweils 20 anfällige und 20 resistente Linien mit 64 AFLP-Primerkombinationen genotypisiert. Mit einem linearen Modell wurde der AFLP-Marker P65M20-105 für ein unbekanntes Resistenzgen ermittelt, der 43 % der phänotypischen Varianz bei Berücksichtigung der Umwelteffekte erklärt (Abbildung 20). Eine Lokalisierung mit Hilfe von nullitetrasomen Linien und AFLP-Marker Karten war nicht erfolgreich.

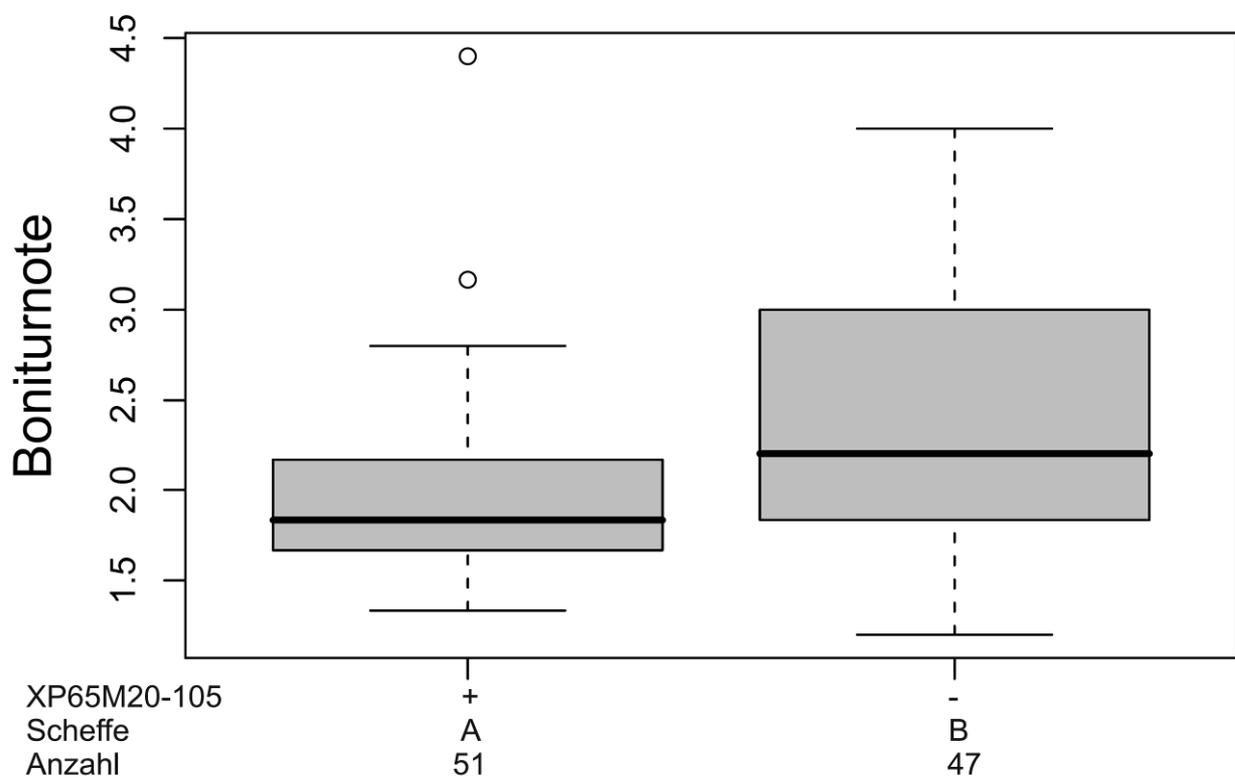


Abb. 20: Verteilung der Genotypenklassen in der Population Convent/92422 basierend auf dem AFLP-Marker P65M20-105

### 3.1.6 Linien mit unbekanntem Resistenzgenen: K2

Die Nachkommenschaften der Kreuzung K2/Audace//Audace zeigten in den Anbaujahren 2003, 2004 und 2005 in Feldkirchen im Mittel einen Befall von 3,4. Dabei wurden 31 Pflanzen besser als 2,5 bonitiert. 65 Linien hatten einen Befall  $> 2,5$  aufzuweisen (Abbildung 24). Eine Spaltung von 3:1 konnte auf einem Signifikanzniveau von 5 % nicht abgelehnt werden ( $p < 0,001$ ). Aufgrund der starken Resistenzgenwirkung (Abbildung 23) in einem sehr anfälligen genetischen Hintergrund schwankte die Verteilung der Boniturnoten über die Jahre hinweg nur mäßig (Abbildung 21). Dem entsprechend konnte eine hohe Korrelation der Boniturwerte zwischen den Umwelten festgestellt werden (Tabelle 24).

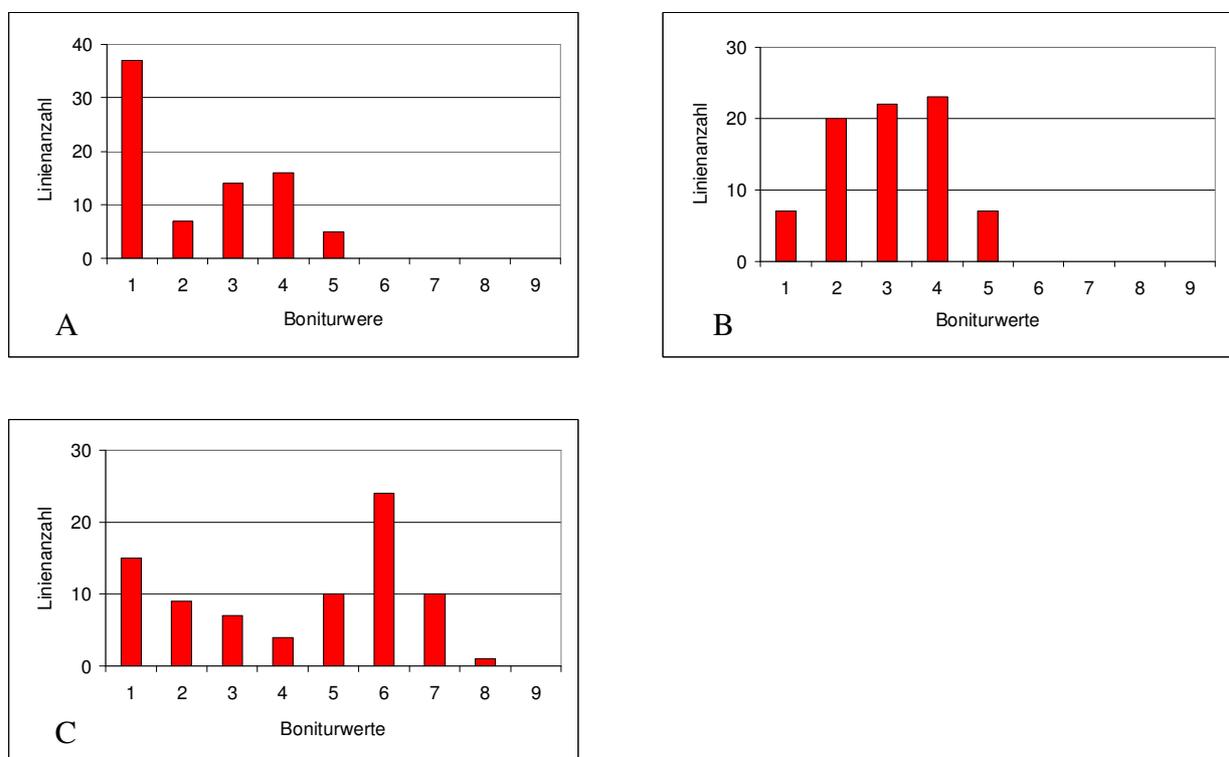


Abb. 21: Verteilung der Mehltau-Boniturnoten aus der Feldprüfung der Population K2/Audace//Audace an den Standorten Feldkirchen 2000 (A), Feldkirchen 2003 (B), Feldkirchen 2004 (C).

Weil die Boniturwerte der Linien eine klare Spaltung aufwiesen wurde eine „bulk-segregant“-Analyse durchgeführt, wobei Pools aus jeweils 10 resistenten und 10 anfälligen Linien mit 256 Primerkombinationen getestet wurden. Dabei konnten zwei Kandidatenmarker (XP67M56-490 und XP67M48-350) in enger Kopplung zum Resistenzgen ermittelt werden. Der Marker XP67M48-350 koppelte in Anlehnung an die Boniturdaten der Gewächshausversuche mit einem genetischen Abstand von 5 cM bei einem Lod von 16,78. Der Marker XP67M56-490 hingegen war mit einem genetischen Abstand von 2 cM bei einem Lod von 19,10 zum Resistenzgen ent-

Tab. 24: Korrelationskoeffizienten und p-Wert der Boniturnoten zwischen den Umwelten in der Population K2/Audace//Audace

	Feldkirchen 2000	Feldkirchen 2003
Feldkirchen 2003	$r = 0,42$ $p < 0,01$	
Feldkirchen 2004	$r = 0,53$ $p < 0,01$	$r = 0,52$ $p < 0,01$

fernt (Abbildung 22). Bei der Berechnung der genetischen Abstände mit Feldboniturdaten ergab sich ein genetischer Abstand des Markers XP67M56-490 von 3,2 cM zum Resistenzgen bei einem LOD von 29,6. Mit einem Abstand von 5,4 cM koppelte hingegen der Marker P67M48-350 zum Resistenzgen (Abbildung 22). Dabei lag das kalkulierte 99%-Konfidenzintervall des Resistenzgens nach Permutationstests mit  $N=1000$  durch das Programm Multi-QTL innerhalb der beiden Resistenzgenmarker (Abbildung 22).

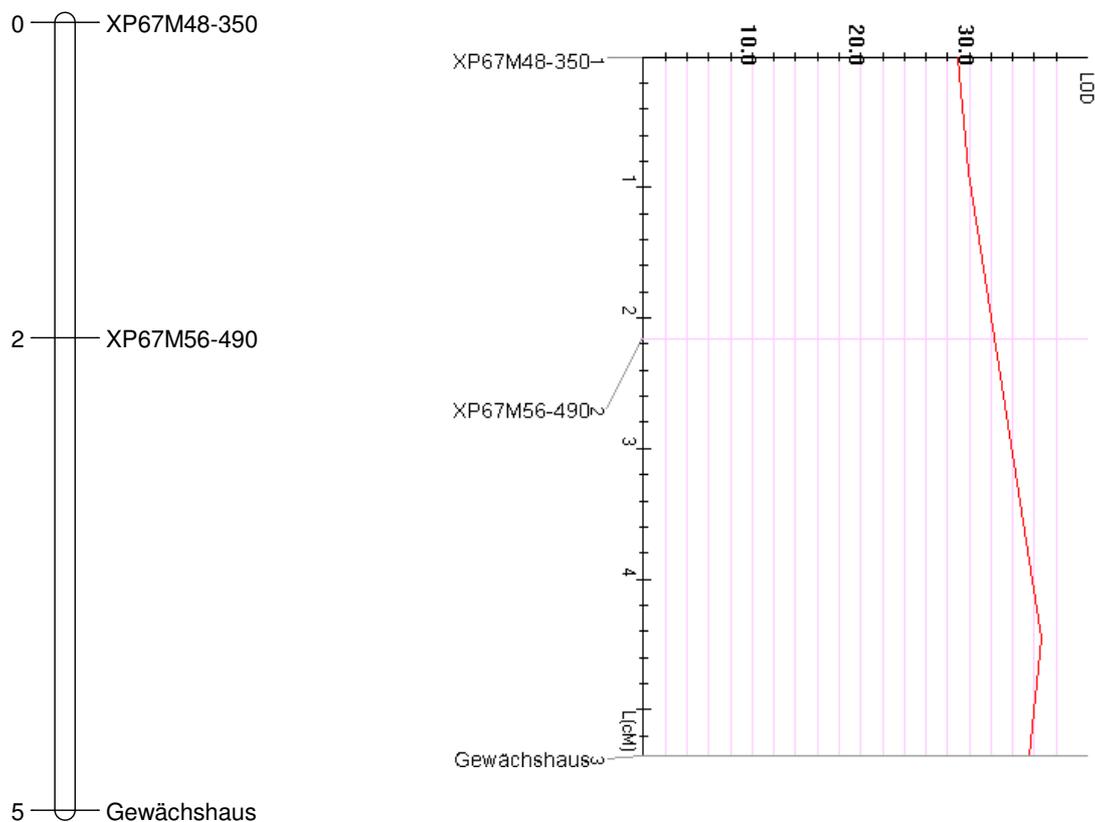


Abb. 22: Genetische Karte für den Mehlauresistenzgenort der Sorte K2 (links) und LOD-Kurve (rechts). Das Resistenzgen liegt distal zu beiden Markern.

Die Boniturmarker XP67M48-350 und XP67M56-490 erklärten dabei 53 % beziehungsweise 51 % der phänotypischen Varianz unter Berücksichtigung der Umwelteffekte. Bei der Verrechnung der Boniturergebnissen aus den Keimpflanzeninokulationen mit den Markern XP67M48-350 und XP67M56-490 konnte ein Bestimmtheitsmaß von 74,8 % beziehungsweise 83 % Prozent ermittelt werden.

Die Differenzierung der Gruppen mit und ohne Resistenzgenmarker XP67M48-350 über die Mittelwerte konnte mit Hilfe des Scheffé-Tests auf 5 % Signifikanzniveau durchgeführt werden. Bei Anwesenheit des Markers konnte ein durchschnittlicher Befall von 2,0 errechnet werden. Ohne Marker betrug der durchschnittliche Befall 4,1 (Abbildung 23).

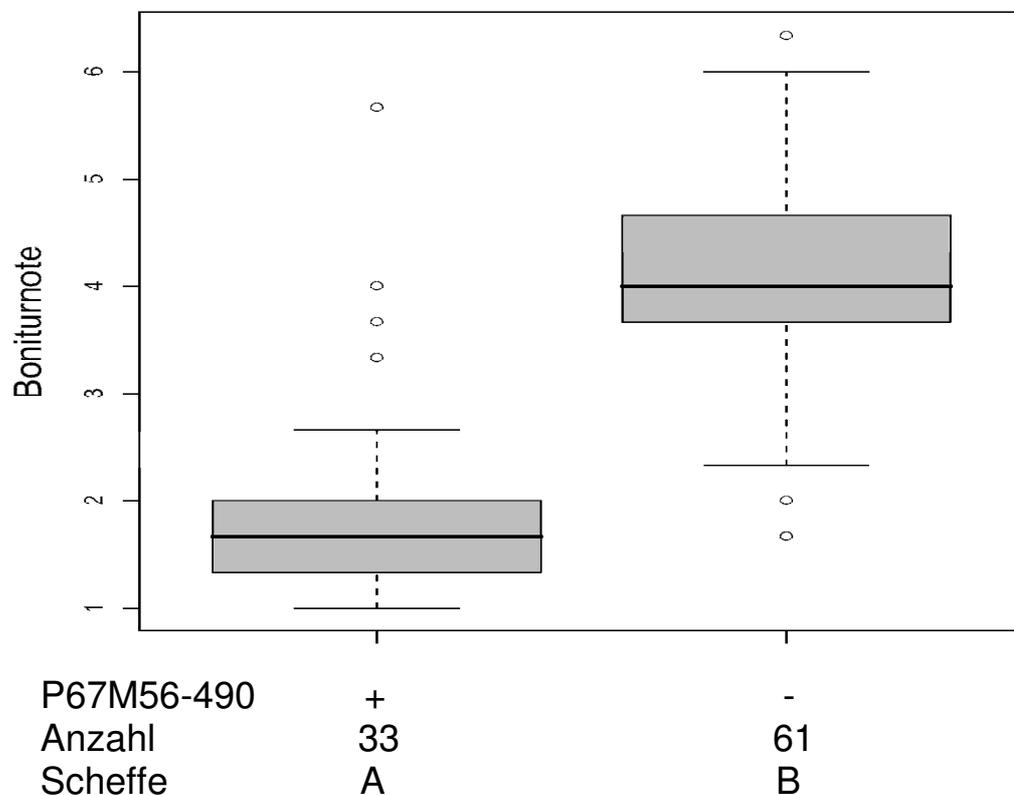


Abb. 23: Boniturverteilung der Linien aus der Kreuzung K2/Audace//Audace in den Subpopulationen klassifiziert mit dem Marker P67M56-490.

### 3.2 Entwicklung von STS und Pyrosequencing-Marker für das Resistenzgen *Pm29*

Grundlage der molekularen Genotypisierung in Bezug auf eine Selektion von Mehлтаuresistenzgenen in Züchtungsprogrammen sind einfach anwendbare Markersysteme. Im Folgenden wird die Entwicklung von Systemen zur Analyse der *Pm29*-Mehлтаuresistenz dargestellt.

#### 3.2.1 STS- Marker

Den fünf sequenzierten Fragmenten der Sorten Dream, Biscay, Carolus, Flair sowie Pova (*Pm29*) konnten eindeutig spezifische Sequenzen zugeordnet werden. Die Sequenzen stammten aus Amplifikaten eines universellen STS-Markers, der von einem kartierten AFLP-Fragment abgeleitet wurde (Zeller et al., 2002). Bei dem Vergleich stimmten die Sequenzen der Sorten Dream, Biscay und Carolus vollständig überein. Flair unterschied sich durch drei Insertions-/Deletionspolymorphismen von den anderen Sorten. Bei der Linie Pova war im Vergleich zu den Kultursorten eine spezifische Insertion vorhanden. Diese wurden für die Markerentwicklung herangezogen (Abbildung 24 und Tabelle 25).

Tab. 25: Sequenzen des STS-Markers für *Pm29*

Primer	Sequenz
STS <i>Pm29</i> -F	5'-CTGGACGGATGAGGGCAT-3'
STS <i>Pm29</i> -R	5'-TCTGAAAAGACTAAAGCTG-3'

Der daraus abgeleitete STS-Marker wurde an 40 europäischen Weizensorten getestet (Tabelle 25 und 26). Dabei konnte nur beim Resistenzdonor Pova (*Pm29*) ein Fragment mit der Länge von 195 Basenpaaren amplifiziert werden (Abbildung 25).

Tab. 26: Mit dem STS-Marker für *Pm29* getestete Sorten

Altos	Compliment	Dream	Kronjuwel	Redford	Toronto
Astron	Contra	Enorm	Magnus	Ritmo	Transit
Boheme	Convent	Estica	Moldau	Ronos	Urban
Caribo	Cubus	Farmer	Orestis	Skater	Vergas
Centrum	Dekan	Herzog	Pajero	Sokrates	
Certo	Diplomat	History	Petrus	Tambor	
Classic	Disponent	Idol	Piko	Tommi	

```

Dream      AGAGCATGAGCTGCTT --GTTT CC ACCCCAAAT TCATCAAAAAC TGCAGGAGCTTTGTACC 163
Biscay     AGAGCATGAGCTGCTT --GTTT CC ACCCCAAAT TCATCAAAAAC TGCAGGAGCTTTGTACC 163
Carolus    AGAGCATGAGCTGCTT --GTTT CC ACCCCAAAT TCATCAAAAAC TGCAGGAGCTTTGTACC 163
Flair      ---GCT TTTTCCGC CC CAGAGTTCA TCCAAAAGT TC A--- AAAC TGCA GGAGCTCT GGACG 147
Pova Pm29  ---GCT TTTTCCGC CC CAGAGTTCA TCCAAAAGT TC C--- AAAC TGCA GGAGCTCT GGACC 147

Dream      GATGAGG-----CCATGGGAC TCCTTGT TG TGCCCATC TG TAGCTTCCT GTCTTCCT 215
Biscay     GATGAGG-----CCATGGGAC TCCTTGT TG TGCCCATC TG TAGCTTCCT GTCTTCCT 215
Carolus    GATGAGG-----CCATGGGAC TCCTTGT TG TGCCCATC TG TAGCTTCCT GTCTTCCT 215
Flair      GATGAGG-----CCATGGGAC TCCTTGT TG TGCCCATC TG TAGCTTCCT GTCTTCCT 200
Pova Pm29  GATGAGGGCATGAGGCCATGGGTC TCCGTGC TGCACCTATC TG CAGCTTCCT GTCTACCT 207

Dream      CCCTCACC CGCCTGCAT CTCTATGGAA ACCAAAAGA TGAAGTGC TT CACC-----AAG 268
Biscay     CCCTCACC CGCCTGCAT CTCTATGGAA ACCAAAAGA TGAAGTGC TT CACC-----AAG 268
Carolus    CCCTCACC CGCCTGCAT CTCTATGGAA ACCAAAAGA TGAAGTGC TT CACC-----AAG 268
Flair      CGCTCACC AAGCTGACACTTTATAATA TC-- ACTGATGGAG TGCCTCAC CC AAGTTCAAG 258
Pova Pm29  CGCTCACC AAGCTGACACTTTATAATA TT-- G- TGATGGAGTGCCTCAC CC AAGTTCAAG 264

Dream      GAG- ---CAAGAA GG CGCCCTTC ACCTCCT CG CATCCCTCCAGGAGCT CGAGTTTT CGA 323
Biscay     GAG- ---CAAGAG GG CGCCCTTC ACCTCCT CG CATCCCTCCAGGAGCT CGAGTTTT CGA 323
Carolus    GAG- ---CAAGAG GG CGCCCTTC ACCTCCT CG CATCCCTCCAGGAGCT CGAGTTTT CGA 323
Flair      AGGACGTC CAAGAGCTAGACTTTTATGATTTGACAAACCTTCAGAGCCT ---CCC TG CAG 315
Pova Pm29  AGGACGTTCAAGAGGACGCGCCCTTCACCTCCTCGCC TCCCTCCAA GAGCT AGACTTTTCTG 324

Dream      TGTTGAC AAGCTTCAGAGCCTCCCTGCAGGA -----355
Biscay     TGTTGAC AAGCTTCAGAGCCTCCCTGCAGGA -----355
Carolus    TGTTGAC AAGCTTCAGAGCCTCCCTGCAGGA -----355
Flair      GAATC-ACGAATTC TGATCCGATA-----338
Pova Pm29  ATTTGAC AACCCTTCAGAGCCTCCCTGCATG---TACGCAGTC-----364

```

Abb. 24: Vergleich der Sequenz von Pova (*Pm29*) mit denen der Sorten Dream, Biscay, Carolus und Flair.

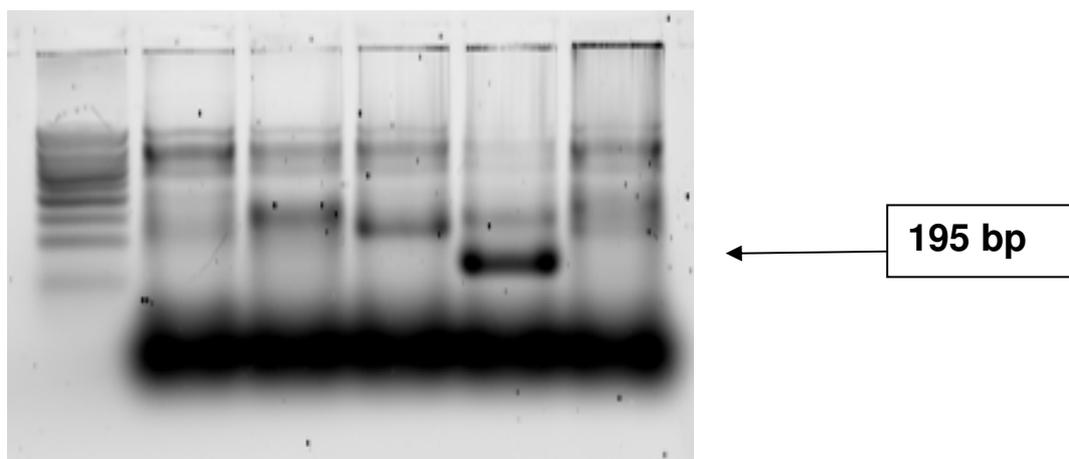


Abb. 25: Agarosegel der Amplifikate des STS-Markers STS Pm29 mit Pova und ausgewählten Sorten. Dargestellt sind von links nach rechts: Längenstandard; Dekan; Apollo; Aristos; Pova (*Pm29*); Biscay.

### 3.2.2 Pyrosequencing Marker

Zur Amplifizierung des Templates für den Nachweis durch Mini-Sequenzierung wurden die universellen Primer aus einem AFLP-Marker für *Pm29* (Tabelle 27) verwendet, da mit diesen in jeder Sorte ein Fragment amplifiziert werden konnte. Der Sequenzierprimer ist direkt vor dem SNP platziert, welcher statt eines Adenins bei Pova ein Cytosin enthält (Abbildung 26 und 37).

Tab. 27: Sequenzen des Pyrosequencing-Markers für *Pm29*.

Primer	Sequenz
Pm29 Forward	5' Biotin-CTG GAC GGA TGA GGG CAT- 3'
Pm29 Reverse	5'-GTC GAA ATC AGA AAA GTC T-3'
Sequencing	5'-TCC AGA GCT CCT GCA GTT T -3'

Zur Überprüfung der Diagnostizität wurde der Pyrosequencing-Marker an 54 Sorten des europäischen Winterweizensortiments getestet (Tabelle 28). Nur bei Pova konnte die für das Mehltaresistenzgen *Pm29* spezifische und direkt nach dem Sequenzierprimer gelegene Base Adenosin anstelle von Cytosin bestimmt werden.

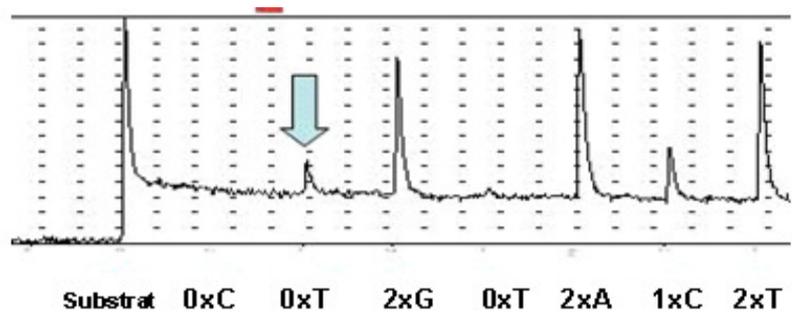
```

Dream      GTTTCCACCCCAAATTCATCAAAACTGCAGGAGCTTTGTACG
Biscay     GTTTCCACCCCAAATTCATCAAAACTGCAGGAGCTTTGTACG
Carolus    GTTTCCACCCCAAATTCATCAAAACTGCAGGAGCTTTGTACG
Flair      GAGTTCATCCAAAGTT---CAAACCTGCAGGAGCTCTGGACG
Pova       GAGTTCATCCAAAGTT---CCAAACTGCAGGAGCTCTGGACG

```

Abb. 26: Sequenzen im Bereich des *Pm29*-SNP. Dargestellt ist der für das Pyrosequencing gewählte Sequenzierprimer (blau) sowie der für *Pm29* diagnostische SNP.

Pyrogramm einer resistenten Linie  
der Kreuzung Pova x Chinese Spring



Pyrogramm einer anfälligen Linie der  
Kreuzung Pova x Chinese Spring

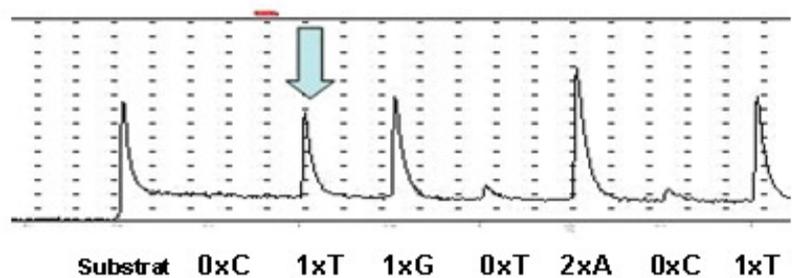


Abb. 27: Pyrogramm einer anfälligen und einer resistenten Linie mit der *Pm29*-Mehltauresistenz.

Tab. 28: Mit dem *Pm29*-Pyrosequencingmarker getestete Sorten und die getestete Linie Pova.

Achat	Classic	Elvis	Kronjuwel	Ritmo
Altos	Compliment	Enorm	Lynx	Ronos
Astron	Contra	Estica	Magnus	Skater
Batis	Convent	Farmer	Moldau	Sokrates
Boheme	Cortez	Flair	Orestis	Tambor
Campari	Cubus	Greif	Pajero	Tommi
Cardos	Dekan	Herzog	Petrus	Toronto
Caribo	Diplomat	History	Piko	Transit
Carolus	Disponent	Huntsman	Pova	Urban
Centrum	Dream	Idol	Red Chief	Vergas
Certo	Drifter	Koch	Redford	

## 4 Diskussion

### 4.1 Phänotypische Charakterisierung der Resistenz

Für die Entwicklung mehrlauresistenter Sorten ist eine sorgfältige Kombination von mehreren Resistenzgenen notwendig. Diese erfolgt durch gezielte Selektion von einzelnen ausgewählten Linien, worüber im Idealfall neben der phänotypischen Ausprägung Kenntnisse über den Genotyp vorliegen. Für die praktische Züchtung stehen für die Selektion zum jetzigen Zeitpunkt Daten aus Feldbonituren, Infektionsversuchen mit Einsporisolen sowie molekulare Marker zur Verfügung. Dabei sind die jeweiligen Untersuchungen unterschiedlich aufwändig.

An Standorten mit hohem Infektionsdruck lässt sich die Resistenz von Zuchtstämmen und Sorten gut und auch billig in Feldversuchen erfassen. Dennoch können verschiedene unterschiedliche Infektionsbedingungen zu unterschiedlichen Boniturergebnissen führen, was den praktischen Züchter vor Probleme in der Auswahl geeigneter Linien für seine Zwecke stellt.

Diese zum Teil erheblichen Varianzen in den Infektionsbedingungen spiegelte sich auch in den Boniturverteilungen der Nachkommenschaften Atlantis/Cortez und Dekan/90018 wieder (Seite 37 und 47). Besonders der Standort Söllingen zeigte in beiden Versuchsjahren einen starken Infektionsdruck. So lag die durchschnittliche Befallsbonitur der Population Atlantis/Cortez im Jahr 2004 in Söllingen um 1,6 höher als in Feldkirchen. Aufgrund der linksschiefen Verteilung der Feldbonituren der Population Atlantis/Cortez wurde in Pulling 2003 von zwei spaltenden wirksamen Hauptgenen ausgegangen. In Söllingen 2004 erwies sich die Population als weniger resistent und zeigte einen höheren Anteil befallener Linien. Dies könnte durch eine andere Pathogenpopulation bedingt sein, die gegen eines der beiden Gene virulent ist. Eine Markeranalyse erlaubt in solchen Fällen neben der Information über die Genetik der Linien auch einen differenzierten Eindruck über die Wirkung der Resistenzgene.

Bei den Nachkommenschaften der Kreuzung Dobros/Kalistos konnte an allen Prüferten im Durchschnitt nur ein sehr niedriger Anteil anfälliger Linien festgestellt werden. Dadurch kann man auf mindestens zwei spaltende Resistenzgene in den Nachkommenschaften der Kreuzung Dobros/Kalistos schließen (Abbildung 12). Die angebaute Population zeigte während des gesamten Versuchszeitraums in allen Umwelten trotz unterschiedlichem Befallsdruck gleichbleibende Resistenzeigenschaften. Dies ist typischerweise für oligo- bis polygen vererbte Resistenzen der Fall. Eine hohe Hintergrundsresistenz der Linien weist auf mehrere quantitativ wirkende Resistenzgene hin, welche unter Umständen für die Züchtung von bedeutender Rolle sein können. Eine umfangreichere Untersuchung der resistenten Linien ohne die beiden

detektierten Resistenzgene nach einer weiteren Kreuzung mit einer anfälligen Sorte wäre mit Sicherheit lohnenswert.

Auch die Population mit dem Resistenzdonor Dekan zeigte ein hohes Resistenzniveau (Abbildung 17). In den Nachkommenschaften spalteten die Resistenzgene *Pm4b*, *Pm5* und *Pm6*. Diese Gene weisen nur noch eine partielle Resistenz auf (Anonym, 2006). Aufgrund dieses hohen Anteils von bekannten, aber weniger wirksamen Resistenzgenen, konnten wegen des hohen Resistenzniveaus keine Rückschlüsse auf die Anzahl zusätzlicher Hauptresistenzgene gezogen werden. Dekan wurde 2009 noch immer mit einer sehr hohen Mehлтаuresistenz in der beschreibenden Sortenliste aufgeführt (Anonym, 2009).

Für einzeln spaltende, qualitativ im Keimpflanzenstadium wirkende Gene kann durch die Inokulation mit Einsporisolaten die genetische Basis häufig exakt definiert werden (Heun und Fischbeck, 1987; Gordei et al., 1998; Petrova et al., 2001; Winzeler et al., 2000). So wurde in dieser Arbeit durch die Inokulation der Blattsegmente mit den Isolaten 23, 24, 28 und 42 bei der Atlantis/Cortez-Population die monogene Spaltung eines qualitativ wirkenden Keimlingsresistenzgens nachgewiesen. Diese Keimlingsresistenz korreliert mit der Feldresistenz. Gleichzeitig wurde mittels Einsporisolaten das Resistenzgen *Pm5* in einzelnen Linien nachgewiesen. Ebenfalls konnte durch die Zuhilfenahme von Einsporisolaten in der Population Dobros/Kalistos, welche wenig befallene Linien hatte, der Abstand des Marker P67M56-230 zum Resistenzgenort ermittelt werden. Dies war mittels Feldbonituren aufgrund des ungenügend kartierten Chromosomenabschnitts durch QTL-Kartierung nicht möglich. Marker beidseits des QTLs sind dafür notwendig. Die Bestimmung von Keimlingsresistenzgenen ist in Populationen mit mehreren Resistenzgenen schwierig und erfordert eine Vielzahl von Einsporisolaten, welche typisch für das Resistenzgen und ausreichend virulent sind. So berichtete Lutz (1991) von Schwierigkeiten, das Resistenzgen *Pm2* in *Ae. squarrosa*-Genotypen aufgrund weiterer Resistenzgene zu identifizieren. Slovakova et al. (2002) forderten die Verwendung von 70 unterschiedlichen Einsporisolaten in Sorten mit mehreren Resistenzgenen, um eine verlässliche Aussage über die vorhandenen Resistenzgene zu bekommen. Dieses Problem zeigte sich in den Nachkommenschaften der Kreuzung Dekan/90018. Dabei war aufgrund von insgesamt vier bekannten und einem unbekanntem Resistenzgen ein sehr hohes Maß an avirulenten Isolaten vorhanden, so dass keine Isolate zur Verfügung standen, die eine sichere Verifizierung in den Kreuzungsnachkommen ermöglichten.

Manche qualitativen Resistenzgene sind mit Hilfe von Einsporisolaten schwierig festzustellen. So gibt es Berichte über die Einflussnahme von schwach wirksamen Resistenzgenen auf die

Eindeutigkeit von Avirulenzmustern (Chantret et al., 2000). Dabei bewirkt ein schwaches Resistenzgen bei der Behandlung ganzer Pflanzen mit Einsporisolaten eine Veränderung der Spaltungsverhältnisse. Aufgrund dieser Tatsache bekräftigten die Autoren die Wichtigkeit der Bonitur im Feldbestand, da damit die Wirkung von Resistenzgenen manchmal besser beschrieben werden kann. Die Anwendung der Gen-für-Gen-Hypothese (Flor, 1955) im Experiment ist nicht immer eindeutig. Auch andere Faktoren wie zum Beispiel die Fitness der verwendeten Sporen nehmen auf die Ausprägung der Resistenzreaktionen Einfluss. Dies zeigte sich auch in den durchgeführten Inokulationsversuchen mit Einsporisolaten bei welchen trotz einem vorhandenen Resistenzgen unerwartet ein leichter Befall festzustellen war. So konnten nach Inokulationversuchen an der Population Classic/G93012 häufig Blattsegmente mit schwachem Befall festgestellt werden. *Pm4b* konnte mit Hilfe der Einsporisolate in den Sorten Atlantis, Dekan und Classic vermutet werden. Allerdings konnte mit Hilfe molekularer Marker für *Pm4b*, welche diagnostisch sind (Hartl et al., 1999), bei Classic das *Pm4b*-Resistenzgen nicht nachgewiesen werden. Dies wurde auf die nicht eindeutigen Resistenzreaktionen aufgrund der Genkombination der Sorte Classic bei den Infektionsversuchen mit Einsporisolaten zurückgeführt. Dabei waren die zur Sorte Ronos (*Pm4b*) avirulenten Isolate ebenfalls in der Sorte Classic avirulent. Jedoch konnten diese Avirulenzreaktionen mit Ausnahme der Isolate 20 und 49 mit den Resistenzgenen *Pm2* und *Pm5* begründet werden. Die Isolate 20 und 49 ergaben einen sehr leichten Befall bei der Sorte Classic.

Insgesamt stellt die Inokulation mit Einsporisolaten eine schnelle und relativ genaue Methode zur Evaluierung qualitativer Resistenzgene dar. Sie ermöglicht die Erstellung von konkreten genetischen Karten. Eine Beurteilung der Resistenzwirkung im Feld, sowie die Ermittlung quantitativer Resistenzen, ist jedoch mit dieser Technik nicht möglich. Deshalb lohnen sich in solchen Fragestellungen primär Feldversuche, wenngleich sie mit höheren Kosten und einem gewissen Risiko durch Witterungsereignisse verbunden sind, die den Befall mit echtem Mehltau hemmen, wie es in 2003 durch die lang andauernde Trockenheit der Fall war.

## 4.2 Genetische Charakterisierung

In der Arbeit wurde mit unterschiedlichen Vorgehensweisen, basierend auf Feldboniturdaten, Mehlauresistenzgene detektiert. Dabei wurde bei den klar spaltenden Populationen, wie Atlantis/Cortez, Dekan/90018, K2/Audace//Audace und Dobros/Kalistos jeweils Mischungen von resistenten bzw. anfälligen Linien erstellt. Durch Unterschiede bei den damit erhaltenen AFLP-Mustern wurden Kandidatenmarker ermittelt. Die Anwendung dieser Technik führte in den Nachkommenschaften der Kreuzung Atlantis/Cortez sowie K2/Audace//Audace zum Erfolg. Bei den Nachkommenschaften der Kreuzungen Dekan/90018 sowie Dobros/Kalistos konnte mit

mit dieser Technik nur einzelne Marker mit Korrelation zur Resistenz identifiziert werden. Kopplungsgruppen für diese Regionen wurden nicht erzielt. Dieses ist mit hohen Hintergrundsresistenzen zu begründen. Erst nach den Analysen von einzelnen Linien der Populationen, sowie den Nachkommenschaften der Kreuzung Convent/92442 konnten Resistenzgenmarker identifiziert werden. Bei den Nachkommenschaften der Kreuzung Classic/G93012 wurden nur ausgesuchte Linien mit den stärksten Resistenzreaktionen (sehr resistent, sehr anfällig) untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse der Populationen zeigen, dass eine „bulked segregant“-Analyse“ auch bei scheinbar gut spaltenden Populationen ungeeignet sein kann. Dies ist auf die Entwicklung in der Resistenzzüchtung zurückzuführen, bei welcher immer mehr Resistenz QTL vorkommen und deshalb eine sinnvolle Bildung von „bulks“ erschweren. Aufgrund der gemachten Erfahrung lohnt es sich bei solchen Populationen zunächst einige ausgesuchte extrem reagierende Linien zu analysieren (Abbildung 28). Sollte dabei ein zum Resistenzgen gekoppelter Marker detektiert werden, kann dieser als Selektionskriterium für die Auswahl von Linien für eine darauf folgende „bulked segregant“-Analyse“ auf Basis von genetischen Pools von Nutzen sein. Dabei werden nur

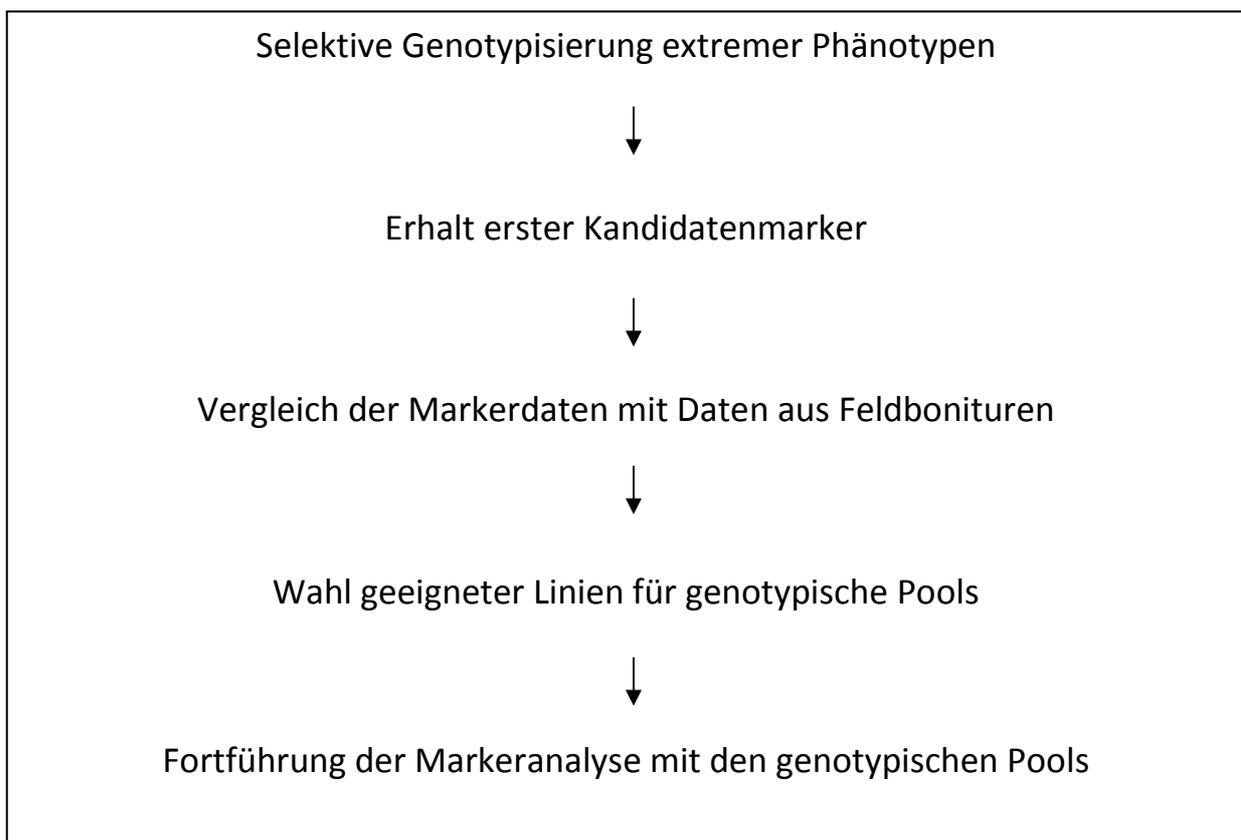


Abb. 28: Vorgehensweise zur effektiven Detektion von Hauptresistenzgenen bei hoher Hintergrundsresistenz

resistente Linien mit einem Resistenzgenmarker eingesetzt. Im Gegenzug werden für den genetischen Pool anfällige Linien gewählt, welche den Resistenzgenmarker nicht haben. Damit können Marker in einem breiten Intervall um das Resistenzgen zuverlässig entdeckt werden.

Gleichzeitig ist damit auch gewährleistet, dass ausschließlich nur resistente Linien für die „bulk segregant“-Analyse verwendet werden, welche auch das Resistenzgen haben. Deshalb erlaubt diese Technik auch eine sichere Detektion von codominanten Markern. Diese Marker sind bei der Lokalisierung mit nullitetrasomen Linien, bei der Entwicklung anderer Nachweissysteme sowie bei der Züchtung sehr wertvoll.

Bei der Population Atlantis/Cortez wurden die Resistenzgenmarker anhand von Versuchen mit Einsporisolen und Feldboniturwerten kartiert. Weiterführende Arbeiten identifizierten das Resistenzgen in Cortez als *Pm3e* (Bauer, mündlich). *Pm3e* konnte bis dahin nicht in deutschen Sorten nachgewiesen werden. Die erhaltenen Karten (Abbildung 10) wiesen eine sehr hohe Ähnlichkeit zueinander auf. Dies ist mit der alleinigen, eindeutigen Resistenzreaktion des Hauptresistenzgens zu erklären. Bei der Kartierung des gefundenen Resistenzgens der Sorte Classic wurde mittels Markeranalyse überprüft, ob dieses QTL mit einem der nachgewiesenen Gene *Pm2* oder *Pm5* koppelt. Bei der Analyse mit dem Mikrosatelliten GWM205 zeigte sich eine Kopplung des QTL in der *Pm2*-Region (Nelson et al., 1995; McIntosh und Baker, 1970). Deshalb wurde dieser QTL auf dem *Pm2*-Locus zugeordnet. Auf dem Chromosomenarm 5DS kommen ebenfalls weitere Mehlttauresistenzgene vor. So wurde von Miranda et al. (2006) *Pm34* auf Chromosom 5D lokalisiert, welches mit XGWM205 nicht koppelt (GrainGenes, Stand 2010). Somit handelt es sich bei dem detektierten Resistenzgen nicht um *Pm34*.

Trotz aufwändiger Untersuchungen der übrigen detektierten Resistenzgene in den Nachkommenschaften Dekan/90018, Convent/92422, K2/Audace//Audace und Dobros/Kalistos, konnten diese nicht lokalisiert werden, da Markerbanden, welche mit dem Resistenzgen koppelten, in der Sorte Chinese Spring festgestellt werden konnten, so dass eine Lokalisierung des Resistenzgens mit nullitetrasomen Linien nicht möglich war. Gleichzeitig wurde versucht die Marker in bereits kartierten Populationen (Schmolke, 2004; Häberle, 2008; Holzapfel, 2009) zu integrieren, was jedoch nicht gelang, da die entsprechenden Markerfragmente in den Eltern der Kartierungspopulationen fehlte.

### **4.3 Assoziation der bekannten Gene mit Feldbonituren**

In den Nachkommenschaften der Kreuzung Classic/G93012 zeigte der Resistenzgenmarker P65M60-700 eine Kopplung in der Nähe des *Pm2*-Genorts. Dabei konnte eine höhere Resistenz

von Linien, welche die beiden Resistenzgene *Pm2* und *Pm5* enthielten, gegenüber Linien mit ausschließlich *Pm5* festgestellt werden. Diese Beobachtung konnte auf einem Signifikanzniveau von 5 % nicht bestätigt werden, was auf die linksschiefe Verteilung in der Subpopulation mit beiden Resistenzgenen und der damit verbundenen hohen Varianz zu erklären sein könnte.

In den Nachkommenschaften der Kreuzung Atlantis/Cortez wurden mit Einsporisolaten (7.1) die Resistenzgene *Pm5* und *Pm4b* festgestellt, welche in den Feldversuchen keinen Einfluss auf die Resistenz zeigten. Ebenfalls konnte in den Nachkommenschaften der Kreuzung Convent/92442 in den Freilandbeobachtungen kein Einfluss des Resistenzgens *Pm4b* auf den Mehлтаubefall beobachtet werden. Sorten mit *Pm4b* ohne zusätzliche wirksame Resistenzgene sind in der Regel sehr anfällig (Anonym, 2008). Umso erstaunlicher ist, dass für den *Pm4-Locus* in den Nachkommenschaften der Kreuzung Dekan/90018 eine signifikante partielle Resistenz nachgewiesen werden konnte. Dies widerspricht den Ergebnissen des Bundessortenamts (Anonym, 2003). Ein möglicher Grund für diese unterschiedlichen Resultate ist, dass viele Linien einer Nachkommenschaft zur Verfügung standen. Damit sind geringe Unterschiede in der Resistenz leichter nachweisbar. Des Weiteren wurde mit Virulenzuntersuchungen gearbeitet. Da solche Versuche nicht unter Feldbedingungen durchgeführt werden, ist daraus zu folgern, dass Versuche mit Einsporisolaten Feldresistenzen nicht zuverlässig richtig widerspiegeln. Allerdings sind aufwendige Feldversuche zur Erfassung der Virulenzsituation im gesamtdeutschen Raum nicht finanzierbar, besonders wenn die Wirkung des genetischen Hintergrunds berücksichtigt werden soll. Die ungewöhnlich starke Wirkung des Resistenzgens *Pm4b* (Abbildung 21 und Tabelle 29) könnte von einem anderen Allel des *Pm4-Locus* herrühren. Hao et al. entdeckten 2008 *Pm23* auf dem Locus von *Pm4*, welches nun in *Pm4c* umbenannt wurde. Als weitere Möglichkeit für die ausgeprägt gute Resistenzwirkung von *Pm4b* könnte der sortenspezifische genetische Hintergrund in dieser Population sein. Eine verstärkende Wirkung des Resistenzgens *Pm4b* mit dem Mehлтаuresistenzgen *Pm5* in dieser Population ist unwahrscheinlich, da in den Nachkommenschaften der Kreuzung Atlantis/Cortez mit *Pm4b* und *Pm5* keine Verbesserung der Resistenz gezeigt werden konnte. Die Ausprägung der Resistenz von *Pm4b* war unabhängig von der Spaltung der anderen Resistenzgene, sodass zwischen diesen Genen epistatische Effekte nicht nachgewiesen werden konnten.

Im Gegensatz dazu konnte in den Nachkommenschaften der Kreuzung Classic/G93012 ein schwacher Effekt des Mehлтаuresistenzgens *Pm5* (Tabelle 29) festgestellt werden. In den Nachkommenschaften der Kreuzung Dekan/90018 ist das Resistenzgen *Pm5* in allen Linien vorhanden. Eine Beurteilung der Wirksamkeit des Resistenzgens ist deshalb nicht möglich. Allerdings ist in den Nachkommenschaften der Kreuzung Dekan/90018 eine hohe Hintergrunds-

Tab. 29: Bekannte Hauptgene und ihre nachgewiesene Wirkung in den Populationen.

<b>Gen</b> <b>Population</b>	<i>Pm2</i>	<i>Pm3</i>	<i>Pm4b</i>	<i>Pm5</i>	<i>Pm6</i>
<b>Atlantis/Cortez</b>	-	-	kein Effekt	kein Effekt	-
<b>Dobros/Kalistos</b>	-	kein Effekt	-	-	-
<b>Dekan/90018</b>	-	-	moderater Effekt	nicht bestimmbar	kein Effekt
<b>Convent/92442</b>	-	-	kein Effekt	-	kein Effekt
<b>Classic/G93012</b>	möglich	-	-	schwacher Effekt	-

resistenz zu erkennen.

Das Resistenzgen *Pm6* konnte in den Nachkommenschaften der Kreuzungen Dekan/90018 oder Classic/G93012 mit Hilfe des AFLP-Markers (S13M20-120) nachgewiesen werden. Es konnte aber in keiner Population eine Wirkung des Resistenzgens *Pm6* gezeigt werden (Tabelle 29).

Die Ergebnisse zeigen, dass qualitative Resistenzgene, wie *Pm5* und *Pm4b*, unterschiedlich stark wirken. Dies kann zum einen mit dem genetischen Hintergrund oder auch mit verschiedenen Allelen begründet werden. Beispielsweise konnte bei den Resistenzgenen *Pm4* in den Nachkommenschaften der Kreuzung Dekan/90018 eine erhöhte Resistenzwirkung festgestellt werden. Diese Genorte können noch eine bedeutende Wirkung bei der Feldresistenz besitzen.

Viele Züchter scheuen aufgrund der hohen Kosten die Selektion mittels molekularer Marker (William et al., 2007). Dabei sollten die maximal vertretbaren Kosten unterhalb von etwa 1 \$ liegen, um wirtschaftlich arbeiten zu können, was derzeit nicht der Fall ist (William et al., 2007). Das Potential zur Kostensenkung molekularer Analysen in der Pflanzenzucht ist jedoch sehr hoch. Dies wird besonders durch moderne vollautomatisierte Methoden ermöglicht. So kostet ein Datenpunkt in der SNP-Analysen im Humanbereich 0,10 \$ (Roses, 2002). Diese Angaben zur Wirtschaftlichkeit sind jedoch nur als grobe Orientierung zu sehen. Die Notwendigkeit und somit die Rentabilität vom Einsatz molekularer Marker hängt neben der Anzahl der Resistenzgene auch von deren Wirkung ab. So können heterozygot vorhandene rezessive Resistenzgene nicht

durch Phänotypisierung erfasst werden. Auch quantitativ wirksame Resistenzgene können nicht ohne molekularbiologische Nachweismethoden effizient berücksichtigt werden.

Gute Marker sollten möglichst eng an ein wirksames Zielgen koppeln, diagnostisch und kodominant sein. Dabei ermöglicht ein kodominanter Marker die Detektion von Heterozygotie an den Resistenzgenorten. Des Weiteren sollen Marker günstig, eindeutig und leicht zu handhaben sein.

In diesem Zusammenhang ist der entwickelte Pyrosequencingmarker für *Pm29* (Zeller et al., 2002), welcher sowohl diagnostisch ist als auch die Heterozygotie detektiert, zu nennen.

Tab. 30: Übersicht verschiedener molekularer Techniken zur QTL-Detektion in Anlehnung an Rosyara (2006)

<b>Bewertungs- kriterien</b> <b>Marker</b>	<b>Reproduzier- barkeit</b>	<b>benötigte DNA-Menge</b>	<b>Vererbung</b>	<b>Zeitaufwand</b>	<b>Kosten</b>
<b>RFLP</b>	gut	viel	codominant	hoch	hoch
<b>RAPD</b>	schwierig	wenig	dominant	niedrig	niedrig
<b>AFLP</b>	gut	wenig	dominant	niedrig	mittel
<b>CAPS</b>	sehr gut	wenig	codominant	mittel	niedrig
<b>STS</b>	sehr gut	wenig	dominant	niedrig	niedrig
<b>Pyrosequencing</b>	sehr gut	wenig	codominant	niedrig	mittel
<b>Mikrosatellit</b>	sehr gut	wenig	codominant	niedrig	niedrig

Neben den in der Praxis aufwändig auszuwertenden AFLP-Markern, wurden in dieser Arbeit STS- sowie Pyrosequencingmarker entwickelt und angewendet. Die entwickelten Marker für das Resistenzgen *Pm29* zeichnen sich durch ihre einfache Handhabung und Eindeutigkeit aus. Aufgrund der guten Wirkung des Resistenzgens *Pm29* und der einfachen Analytik werden diese Marker bereits jetzt in Züchtungsprogrammen verwendet. Da beim Pyrosequencing auch in heterozygoten Linien Resistenzgene identifiziert werden können, ist die Pyrosequencingmethode am geeignetsten (Tabelle 30).

Die markergestützte Selektion findet in der Züchtung in Bezug auf die Mehlttauresistenz unterschiedliche Anwendungen.

Einzelne qualitative Resistenzgene verlieren sehr schnell an ihrer Resistenzgenwirkung, sodass eine Kumulierung verschiedener Mehlttauresistenzgene (Pyramidisierung) in der Sortenentwicklung notwendig ist. Dies ist in der klassischen Züchtung sehr aufwändig, da eine Phänotypisierung in der Regel keinen Schluss auf die Anzahl und Art der Resistenzgene in den einzelnen Linien zu lässt.

Besonders rezessiv, quantitativ oder polygen wirksame Resistenzgene können mit der markergestützten Selektion effektiv identifiziert werden, was eine effizientere Selektion ermöglicht. Des Weiteren ist diese Technik unabhängig von Umwelteinflüssen, sodass zum Beispiel auch in heißen Sommermonaten mit sehr niedrigem Infektionsdruck sicher die Resistenzgene identifiziert werden können. Im Jahr 2003 zeigte nahezu keine Linie der Nachkommenschaften der Kreuzungen Dekan/90018 sowie Dobros/Kalistos mit hohen Hintergrundsresistenzen Befall, sodass eine Beurteilung der Feldresistenz unter normalen Witterungsbedingungen nicht möglich war. Zudem ist es möglich mit Markern epistatische Effekte mittels Pyramidisierung von Resistenzgenen gezielt zu nutzen, um die maximale Resistenzwirkung eines Gens zu erzielen.

Um den Verlust der Resistenzwirkungen entgegenzutreten, spielt die Züchtungsgeschwindigkeit eine wichtige Rolle. Eine schnelle markergestützte Sortenentwicklung mittels Pyramidisierung von Resistenzgenen erlaubt, dass Resistenzgene früher und länger genutzt werden können. Eine effektive Anreicherung von Resistenzgenen ist durch reine Phänotypisierung nicht möglich, da von der Ausprägung der Resistenz nicht auf die Anzahl sowie der Art der Resistenzgene geschlossen werden kann.

Eine weitere Anwendung der markergestützten Selektion besteht in der Introgression von Resistenzgenen aus Wildmaterial mittels Rückkreuzung, um sie für weitere Züchtungszwecke verfügbar zu machen. So wurde aus *A. ovata* das bearbeitete Resistenzgen *Pm29* in *T. aestivum* gebracht, welches nun in Pova zu finden ist (Zeller et al., 2002). Resistenzgene aus Wildmaterial sind häufig mit qualitätsmindernden Genen gekoppelt (genetic linkage drag). Hier können Marker zur Eliminierung dieser Gene beitragen. Sind Linien mit einem Hauptresistenzgen nicht mit Mehltau befallen, obwohl man gleichzeitig mit sehr eng gekoppelten Markern nicht das Resistenzgen nachweisen kann, hat eine Rekombination in unmittelbarer Nähe zum Resistenzgen statt gefunden. In solchen Linien ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass zum Resistenzgen

gekoppelte unerwünschte Gene nicht mehr vorhanden sind. Diese Linien sollten gezielt selektiert werden.

Die detektierten Gene für unbekannte Mehltaresistenzen wiesen eine unterschiedlich starke Wirkungsweise in den untersuchten Linien auf. Dabei zeigte sich, dass das detektierte Resistenzgen in den Nachkommenschaften der Kreuzung Atlantis/Cortez den Befall stark senkt. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass eine Nutzung dieses Gens in Züchtungsprogrammen durchaus sinnvoll ist. Der Marker P66M50-240 koppelt mit einem genetischen Abstand von 7 cM. Dennoch scheint der Marker wegen der guten Resistenzgenwirkung für Züchtungszwecke geeignet zu sein, auch wenn er nicht diagnostisch ist. Wenngleich der Einsatz dieses Resistenzgenmarkers mit einer gewissen Unsicherheit durch Rekombinationsereignisse behaftet ist, kann er laut Kuchel et al. (2005), noch erheblich zur Effizienzsteigerung in der Züchtung beitragen. Aus diesem Grund ist für die angewandte Züchtung auch der Einsatz dieses Markers zweckdienlich.

Da der Marker P66M50-240 nicht diagnostisch ist, müssen vor dem Einsatz des Markers unbedingt die Eltern molekulargenetisch auf Polymorphie getestet werden.

Der Resistenzgenmarker XP67M56-490 zeigte in den Nachkommenschaften K2/Audace//Audace eine enge Kopplung mit einem genetischen Abstand von 2 cM zu Resistenzgen. In Anwesenheit des Resistenzgens konnte ein deutlich niedriger Befall der untersuchten Linien festgestellt werden. Aus diesem Grund ist der Einsatz des Resistenzgenmarkers in Züchtungsprogrammen sinnvoll. Da auch dieser Marker nicht diagnostisch ist, müssen auf jeden Fall die Kreuzungseltern auf ihre Markerallele getestet werden.

Bei Linien mit dem Resistenzgenmarker P63M52-310, welche mit einem Mehltaresistenzgen der Sorte Dekan koppeln, konnte kaum ein Befall mit Mehltau festgestellt werden. Die untersuchten Linien der Nachkommenschaften Dekan/90018 zeigen eine Verbesserung der Resistenz um etwa 1,6 Boniturnoten auf. Aufgrund der Tatsache, dass nur ein Marker zur Verfügung stand, konnte der Abstand zum Resistenzgen nicht bestimmt werden. Da das Resistenzgen sehr wirksam ist, gewinnt es züchterisch eine hohe Bedeutung. Die Bedeutung des Resistenzgens auf dem *Pm4*-Allel ist unterschiedlich einzuschätzen. Handelt es sich dabei um ein unbekanntes Allel, so ist die Berücksichtigung des Resistenzgens in der Praxis sinnvoll. Sollte es sich um das Resistenzgen *Pm4b* handeln, so kann die Wirkung der Feldresistenz stark vom genetischen Hintergrund abhängen, sodass dieses Resistenzgen primär in

Rückkreuzungsprogrammen mit Dekan oder verwandtem Material als rekurrentem Elter sinnvoll erscheint.

Die Bedeutung der Resistenzgenmarker aus der Kreuzung Dobros/Kalistos ist nicht eindeutig einzuschätzen. Der Anteil an resistenten Linien war sehr hoch, sodass folglich von mehreren quantitativ wirksamen Resistenzgenen im Hintergrund ausgegangen wird. Es ist dennoch sinnvoll diese QTL in Züchtungsprogrammen nochmals zu testen. Der Resistenzgenmarker P67M56-230 liegt 14 cM vom Mehлтаuresistenzgen entfernt. Dieser genetische Abstand ist für eine eindeutige Nachweismethode des Resistenzgens nicht geeignet.

In den Nachkommenschaften der Kreuzung Convent/92422 konnten bei Linien mit dem Resistenzgenmarker P65M20-310 eine Verringerung des Mehлтаubefalls festgestellt werden. Allerdings gab es insgesamt nur acht Linien, welche die Boniturnote eins erhielten. Dies deutet auf einen Zusammenbruch des mit dem Marker koppelnden Mehлтаuresistenzgens hin. Die Bedeutung dieses QTLs in der praktischen Züchtung wird deshalb als sehr gering eingeschätzt. Der in den Nachkommenschaften der Kreuzung Classic/G93012 detektierte QTL in der Nähe des *Pm2*-Locus zeigte eine schwache Wirkung auf die Mehлтаuresistenz. Deshalb wird von der Sorte Classic als Resistenzgendonor abgeraten.

## 5 Zusammenfassung

In den Weizennachkommenschaften der Kreuzungen mit den Resistenzträgern Cortez, Dobros, Dekan, Convent, Classic sowie K2 konnten unterschiedliche Ausprägungen der Mehlauresistenzen beobachtet werden. Eine wichtige Rolle spielte dabei die Präsenz bereits bekannter Resistenzgene im genetischen Hintergrund. So konnte in den Nachkommenschaften der Kreuzung Dekan/90018 die Wirkung eines Mehlauresistenzgens in der Region des *Pm4*-Locus auf den Befall im Feld beobachtet werden, was in den Nachkommenschaften der Kreuzungen Atlantis/Cortez und Convent/92442 nicht der Fall war.

Aufgrund der Analyse mit SSR-Markern, die zum Resistenzgenort *Pm5* eng gekoppelt sind, wurde ein Effekt auf die Feldresistenz in der Nachkommenschaft der Kreuzung Atlantis/Cortez ausgeschlossen. Hingegen konnte in den Nachkommenschaften der Kreuzung Classic/G93012 eine Wirkung des Resistenzlocus auf die Feldresistenz gezeigt werden.

Für das hochwirksame wirksame Resistenzgen, das in der Sorte Cortez detektiert wurde, wurden drei AFLP-Marker mit einem genetischen Abstand zwischen 7 und 22 cM identifiziert, wobei der Marker P66M50-250 am besten zum Resistenzgen koppelte. Bis auf wenige Ausnahmen zeigten Linien der spaltenden Population mit diesem Marker einen sehr geringen Mehлтаubefall. Für zwei im Feld sehr wirksame und unbekannte Resistenzgene der Sorte Dobros wurde jeweils ein molekularer Marker (P67M56-230 und P66M60-260) identifiziert, wobei für den Marker P67M56-230 ein genetischer Abstand von 14 cM im Keimpflanzentest zum Resistenzgen berechnet wurde. Für das im Feld wirksame Resistenzgen der Sorte Dekan konnte der AFLP-Marker P63M52-310 entwickelt werden. Er erklärte 18 % der phänotypischen Varianz in dieser Population. Ein weiterer Marker (P65M20-105) konnte für das partiell wirksame unbekannte Resistenzgen der Sorte Convent gefunden werden. Dieses liegt in der Nähe des *Pm2*-Resistenzlocus auf Chromosom 5DS. In einem genetischen Abstand von 2 bzw. 3 cM konnten zwei Marker für das hochwirksame Resistenzgen in der Donorlinie K2 etabliert werden. Diese eng gekoppelten molekularen Marker stellen einen idealen Ausgangspunkt für die Lokalisierung dieses Gens und Entwicklung von Markern zur Selektion dar.

Die Resistenzwirkungen der bekannten Mehlauresistenzgene, die häufig in deutschen Sorten beschrieben wurden und nur noch quantitativ reagieren, unterschieden sich innerhalb der untersuchten Populationen, sodass von einer Abhängigkeit der Resistenzgenwirkung vom genetischem Hintergrund auszugehen ist. Die Verteilung des Mehлтаubefalls innerhalb der Nachkommenschaften der untersuchten Kreuzungen lassen den Schluss zu, dass die Mehlauresistenz im deutschen Winterweizen oligogen vererbt wird.

---

Die entwickelten Marker für im Feld wirksame Resistenzgene ermöglichen nun eine effektive markergestützte Selektion zur Entwicklung neuer, mehlttauresistenter Sorten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Anonym (2003) Beschreibende Sortenliste Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen und Hackfrüchte. Deutscher Landwirtschaftsverlag, Hannover
- Anonym (2006) Beschreibende Sortenliste Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen und Hackfrüchte. Deutscher Landwirtschaftsverlag, Hannover
- Anonym (2008) Beschreibende Sortenliste Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen und Hackfrüchte. Deutscher Landwirtschaftsverlag, Hannover
- Anonym (2009) Beschreibende Sortenliste Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen und Hackfrüchte. Deutscher Landwirtschaftsverlag, Hannover
- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 208-218
- Aslam M, Schwarzbach E (1980) An inoculation technique for quantitative studies of brown rust resistance in barley (*Hordeum*). *Phytopathology* 1: 87-91
- Aubertot JN, West JS, Boussett-Vaslin L, Salam MU, Barbetti MJ, Diggle AJ (2006) Improved Resistance Management for Durable Disease Control: A Case Study of Phoma Stem Canker of Oilseed Rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* 114: 91-106
- Bartels G, Backhaus GF (2002) <http://www.bba.de/veroeff/mitt/pdfs/mitt373.pdf>
- Bent A (1996) Plant disease resistance genes: Function meets Structure. *The Plant Cell* 8: 1757-1771
- Bertin I, Zhu JH, Gale MD (2005) SSCP-SNP in pearl millet - a new marker system for comparative genetics. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 1467-1472

- Bhullar N, Street K, Mackay M, Yahiaoui N, Keller B (2009) Unlocking wheat genetic resources for the molecular identification of previously undescribed functional alleles at the *Pm3* resistant locus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 9519-9524
- Bitsch C, Groeger S, Lelley T (1998). Effect of parental genotypes on haploid embryo and plantlet formation in wheat x maize crosses. Euphytica 103: 319-323
- Bomblies K, Weigel D (2007) Hybrid necrosis: autoimmunity as a potential gene-flow barrier in plant species. Nature Reviews Genetics 8: 382-383
- Bossolini E, Krattinger SG, Keller B (2006) Development of simple sequence repeat markers specific for the *Lr34* resistance region of wheat using sequence information from rice and *Aegilops tauschii*. Theoretical and Applied Genetics 6: 1049-1062
- Boyd LA, Smith PH, Hart N (2006) Mutants in wheat showing multipathogen resistance to biotrophic fungal pathogens. Plant Pathology 55: 475-484
- Braun U (1995) The powdery mildews (Erysiphales) of Europe. G. Fischer-Verlag Jena.
- Briggle LW (1960) Sources of resistance to powdery mildew from tetraploid Triticum species. Agronomy Abstracts 45
- Briggle LW (1966a) Three loci in wheat involving resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. Crop Science 6: 461-465
- Briggle LW (1966b) Transfer of resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* from Khapli emmer and Yuma durum to hexaploid wheat. Crop Science 6: 459-461
- Briggle LW (1969) Near-isogenic lines of wheat with genes for resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. Crop Science 9: 70-72
- Caldo RA, Nettleton D, Wise RP (2004) Interaction-Dependent Gene Expression in *Mla*-Specified Response to Barley Powdery Mildew. The Plant Cell 16: 2514-2528

- Chantret N, Pavoine M, Doussinault G (1999) The Race-Specific Resistance Gene to Powdery Mildew, *MIRE*, Has a Residual Effect on Adult Plant Resistance of Winter Wheat Line RE714. *Phytopathology* 89: 533-539
- Chantret N, Sourdille P, Röder M, Tavaud M, Bernard M, Doussinault G (2000) Location and mapping of the powdery mildew resistance gene *MIRE* and detection of a resistance QTL by bulked segregant analysis (BSA) with microsatellites in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1217-1224
- Chao W, Sharp PJ, Worland AJ, Warham EJ, Koebner RMD, Gale MD (1989) RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 495-504
- Daamen RA (1989) Assessment of the profile of powdery mildew and its damage function at low disease intensities in field experiments with winter wheat. *European journal of plant pathology* 95: 85-108
- Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833
- Daud HM, Gustafson JP (1996) Molecular evidence for *Triticum speltoides* as a B-genome progenitor of wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 39: 543-548
- Donini P, Koebner RMD, Ceoloni C (1995) Cytogenetic and molecular mapping of wheat-*Aegilops longissima* chromatin breakpoints in powdery-mildew resistant introgression lines. *Theoretical and Applied Resistance* 91: 738-743
- Dvorák J, di Terlizzi P, Zhang HB, Resta P (1993) The evolution of polyploid wheats: Identification of the A genome donor species. *Genome* 36: 21-31
- Dvorák J, Zhang HB (1990) Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 87: 9640-9644

- Eichmann R, Dechert C, Kogel KH, Hüchelhoven R (2006) Transient over-expression of barley BAX Inhibitor-1 weakens oxidative defence and MLA12-mediated resistance to *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *Molecular Plant Pathology* 7: 543-552
- Elliot C, Müller J, Miklis M, Bhat RA, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2005) Conserved extracellular cysteine residues and cytoplasmic loop-loop interplay are required for functionality of the heptahelical MLO protein. *Biochemistry Journal* 385: 243-254
- Elstner EF, Oßwald W, Schneider I (1996) *Phytopathologie - Allgemeine und biochemische Grundlagen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Enyedi AJ, Yalpani N, Silverman P, Raskin I (1992) Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* 70: 879-886
- FAO (Stand 2010) <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Feldman M (1978) New evidence on the origin of the B genome of wheat. *Proceedings of the 5th International Wheat Genetics Symposium*, Indian Academy of Science, New Delhi, 120-132
- Feldmann M (2001) Origin of cultivated wheat. In: Bonjean A, Angus W (eds) *The world wheat book- a history of wheat breeding*, Lavoisier Publishing, France 3-56
- Felsenstein FG (1991) Virulenz und Fungizidsensitivität des Weizenmehltaus, *Erysiphe graminis* DC.f.sp.*tritici* Marchal, in Europa. Dissertation. Technische Universität München, Freising-Weihenstephan
- Flor HH (1955) Host-parasite interaction in flax rust- its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685
- Gish W, States D (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics* 3: 266 -272

- Gomez-Gomez L, Boller T (2000) FLS2 an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 5: 1003-1011
- Gordei SI, Hsam SLK, Zeller FJ (1998) Identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). X. Cultivars grown in Belarus and neighbouring countries. *Journal of Applied Genetics* 39: 1-8
- Grain Genes (Stand 2010) <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>
- Häberle J (2008) Kartierung und Validierung von Resistenz-QTL gegen Ährenfusarium in Winterweizen. Dissertation. Technische Universität München, Freising-Weihenstephan
- Häberle J, Schweizer G, Schondelmaier J, Zimmermann G, Hartl L (2009) Mapping of QTL for resistance against *Fusarium* head blight in the winter wheat population Pelikan//Bussard/Ning8026. *Plant Breeding* 128: 27-35
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773-1791
- Hao Y, Liu A, Wang Y, Feng D, Gao J, Li X, Liu S, Wang H (2008) *Pm23*: a new allele of *Pm4* located on chromosome 2AL in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 1205-1212
- Hart GE, Gale MD, McIntosh RA (1990) Biochemical/molecular loci of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* 2n= 42 genomes AABBDD). In: O'Brien SJ (ed.) *Genetic maps Book 6: Plants*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, 28-38
- Hartl L, Mohler V, Zeller FJ, Hsam SKL, Schweizer G (1999) Identification of AFLP markers closely linked to the powdery mildew resistance genes *Pm1c* and *Pm4a* in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 42: 322-329
- Hartl L, Weiss H, Stephan U, Zeller FJ, Jahoor A (1995) Molecular identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied genetics* 90: 601-606

- Hartl L, Weiss H, Zeller FJ, Jahoor A (1993) Use of RFLP markers for the identification of alleles of the *Pm3* locus conferring powdery mildew resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 86: 959-963
- Heath MC (1998) Involvement of reactive oxygen species in the response of resistant (hypersensitive) or susceptible cowpeas to the cowpea rust fungus. *New Phytologist* 138: 251-263
- Heun M, Fischbeck G (1987) Genes for powdery mildew resistance in cultivars of spring wheat. *Plant Breeding* 99: 282-288
- Hoffman G, Schmutterer H (1983) Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Ulmer Verlag 2. Auflage
- Hovmøller MS (1989) Race specific powdery mildew resistance in 31 northwest european wheat cultivars. *Plant Breeding*: 103: 228-234
- Holzappel J (2009) Kartierung von Resistenzloci gegen Ährenfusarium im europäischen Winterweizen unter Berücksichtigung des Kurzstrohgens *Rht-D1*. Dissertation. Technische Universität München, Freising-Weihenstephan
- Holzappel J, Voss HH, Miedaner T, Korzun V, Häberle J, Schweizer G, Mohler V, Zimmermann G, Hartl L (2008) Inheritance of resistance to fusarium head blight in three european winter wheat populations. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 1119-1128
- Hsam SLK, Huang XQ, Zeller FJ (2001) Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). 6. Alleles at the *Pm5* locus. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 127-133
- Huang XQ, Hsam SLK, Zeller FJ (1997) Identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). IX. Cultivars, land races and breeding lines grown in China. *Plant Breeding* 116: 233-238

- Huang XQ, Hsam SLK, Zeller FJ, Wenzel G, Mohler V (2000) Molecular mapping of the wheat powdery mildew resistance gene *Pm24* and marker validation for molecular breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 407-414
- Huang XQ, Wang LX, Xu MX, Röder M (2003) Microsatellite mapping of the powdery mildew resistance gene *Pm5e* in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106: 858-865
- Hückelhoven R, Kogel KH (1998) Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 292-300
- Hückelhoven R (2007) Cell Wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Reviews of Phytopathology* 45: 101-27
- Hutcheson SW (1998) Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36: 59-90
- Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K, Scheel D (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub> from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 4800-4805
- Jahoor A (1986) Mehltaresistenz israelischer Wildgersten- Resistenzspektrum, Vererbung und Lokalisierung. Dissertation. Technische Universität München, Freising-Weihenstephan
- Jakobson I, Peusha H, Timofejeva L, Järve K (2005) Adult plant and seedling resistance to powdery mildew in a *Triticum aestivum* x *Triticum militinae* hybrid line. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 760-769
- Jørgensen HJ, Jensen CJ (1972) Genes for resistance to wheat powdery mildew in derivatives of *Triticum timopheevi* and *T. carthlicum*. *Euphytica* 21: 121-128

- Jørgensen HJ, Jensen CJ (1973) Gene *Pm6* for resistance to powdery mildew in wheat. *Euphytica* 22: 423
- Keller M, Keller B, Schachermayr G, Winzeler M, Schmid JE, Stamp P, Messmer MM (1999) Quantitative trait loci for resistance against powdery mildew in a segregating wheat x spelt population. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 903-912
- Kimber G, Feldmann M (1987) Wild wheat, an introduction. Special Report 353, College of Agric, University of Missouri Press, Columbia, USA, 1-142
- Knott DR (1987) Transferring alien genes to wheat. In: Heyne EG (ed). *Wheat and Wheat Improvement*, 2nd ed, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, 462-471
- Konarev VG, Gavriilyuk IP, Gubareva NK, Peneva TI (1979) About nature and origin of wheat genomes on the data of biochemistry and immunochemistry of grain proteins. *Cereal Chemistry* 56: 272-278
- Korff M, Wang H, Léon J, Pillen K (2005) AB-QTL analysis in spring barley. I. Detection of resistance genes against powdery mildew, leaf rust and scald introgressed from wild barley. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 583-590
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Annual Eugenics* 12: 172-175
- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Keller (2008) Fine-mapping of the durable leaf rust resistance gene *Lr34* using sequence information from *Brachypodium* and *Aegilops tauschii*. <http://ses.library.usyd.edu.au/bitstream/2123/3200/1/O32.pdf>
- Kuchel H, Ye G, Fox R, Jefferies S (2005) Genetic and economic analysis of a targeted marker-assisted wheat breeding strategy. *Molecular Breeding* 16: 67-78
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275

- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181
- Langridge P, Lagudah ES, Holton TA, Appels R, Sharp PJ, Chalmers KJ (2001) Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *The Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1043-1077
- Law CN, Wolfe MS (1966) Location of genetic factors for mildew resistance and ear emergence time on chromosome 7B of wheat. *Genome* 8: 462-470
- Lebsock KL, Briggie LW (1974) Gene *Pm5* for resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* in Hope wheat. *Crop Science* 14: 561-563
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593
- Limpert E, Clifford BC, Dreiseitl A, Johnson R, Müller K, Roelfs A, Wellings C (1994) Systems of designation of pathotypes of plant pathogens. *EPPO Bulletin* 24: 109-112
- Lundqvist U, Lundqvist A (1992) Dominant resistance to barley powdery mildew race D1, isolated after mutagen treatments in four highbred barley varieties. *Hereditas* 115: 241-253
- Lutz J (1991) Mehltaresistenz in *Aegilops squarrosa* L.- Evaluierung, Gentransfer sowie Expression und Vererbung in synthetischen Weizenlinie. Dissertation. Technische Universität München, Freising-Weihenstephan
- Lutz J, Hsam SLK, Limpert E, Zeller FJ (1995) Chromosomal location of powdery mildew resistance genes in *Triticum aestivum* L. (common wheat) 2. Genes *Pm2* and *Pm19* from *Aegilops squarrosa* L.. *Heredity* 74: 152-156

- Lutz J, Limpert E, Bartos P, Zeller FJ (1992) Identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.) 1. Czechoslovakian cultivars. *Plant Breeding* 108: 33-39
- Ma ZQ, Sorrells ME, Tanksley SD (1994) RFLP markers linked to powdery mildew resistance genes *Pm1*, *Pm2*, *Pm3* and *Pm4* in wheat. *Genome* 37: 871-875
- Mains B (1933) Host specialization of *Erysiphe graminis tritici*. *Proceedings of the national academy of sciences USA* 19: 49-53
- Mains B (1934) Inheritance to powdery mildew, *Erysiphe graminis tritici* in wheat. *Phytopathology* 24: 1257-1261
- McCallum C, Comai L, Greene EA, Henikoff S (2000) Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology* 123: 439-442
- McIntosh RA, Baker EP (1970) Cytogenetical studies in wheat iv. Chromosome location and linkage studies involving the *Pm2* locus for powdery mildew resistance. *Euphytica* 19: 71-77
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 9828
- Mielke H, Schöber-Butin B (1999) *Pflanzenschutz bei Nachwachsenden Rohstoffen, Kartoffel, Getreide und Mais*. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin und Braunschweig, Heft 386
- Mingeot D, Chantret N, Baret BV, Dekeyser A, Boukhatem N, Sourdille P, Doussinault G, Jacquemin JM (2002) Mapping QTL involved in adult plant resistance to powdery mildew in the winter wheat line RE714 in two susceptible genetic backgrounds. *Plant Breeding* 121: 133-140

- Miranda LM, Murphy JP, Marshall D, Leath S (2006) *Pm34*: A new powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops tauschii* Coss. to common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1497-1504
- Mohler V, Klahr A, Wenzel G, Schwarz G (2002) A resistance gene analog useful for targeting disease resistance genes against different pathogens on group 1S chromosomes of barley, wheat and rye. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 364-368
- Nelson JC, Sorrells ME, Van-Deynze AE, Lu YH, Atkinson M, Bernard M, Leroy P, Faris JD, Anderson JA (1995) Molecular mapping of wheat. Major genes and rearrangements in homoeologous groups 4, 5, and 7. *Genetics* 141: 721-731
- Nürnberg T, Brunner F (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 318-324
- Nyquist WE (1963) Inheritance of powdery mildew resistance in hybrids involving a common strain derived from *Triticum timopheevi*. *Crop Science* 3: 40-43
- Ogihara Y, Tsunewaki K (1988) Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 321-332
- O'Neill LA, Greene C (1998) Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *Journal of Leukocyte Biology* 63: 650-657
- Ooijen JW, Voorrips RE (2001) Join Map® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International. Wageningen, The Netherlands
- Osborn AE (1996) Preformed antimicrobial compounds in plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* 8: 1821-1831

- Paillard S, Goldringer I, Enjalbert J, Trottet M, David J, de Vallavieille-Pope C, Brabant P (2000) Evolution of resistance against powdery mildew in winter wheat populations conducted under dynamic management. II. Adult plant resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 457-462
- Petrova N, Hsam SLK, Spetsov P, Zeller FJ (2001) Identification of powdery mildew and leaf rust resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) cultivars grown in Bulgaria and Russia. *Plant Genetics Resources Newsletter* 122: 32-35
- Powers HR, Sando WJ (1960) Genetic control of the host-parasite relationship in wheat powdery mildew. *Phytopathology* 50: 454-457
- Pugsley AT, Carter MV (1953) The resistance of twelve varieties of *Triticum vulgare* to *Erysiphe graminis tritici*. *Australian Journal of Biological Science* 6: 335-346
- Quint M, Mihaljevic R, Dussle CM, Xu ML, Melchinger AE, Lübberstedt T (2002) Development of RGA-CAPS markers and genetic mapping of candidate genes for sugarcane mosaic virus resistance in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 355-363
- Rilay R, Unrau J, Chapman V (1958) Evidence on the origin of the B genome of wheat. *Journal of Heredity* 49: 91-98
- Robertson DS (1989) Understanding the relationship between qualitative and quantitative genetics. In: Helentjaris T, Burr B (eds). *Development and application of molecular markers to problems in plant genetics*. Cold Spring Harbour LabPress, 81-88
- Roses AD (2002) Pharmacogenetics place in modern medical science and practice. *Life sciences* 70: 1471-1480
- Rosyara UR (2006) Requirement of robust molecular marker technology for plant breeding applications. *Journal of Plant Breeding Group* 1: 67-72

- Sallares R, Brown TA (1999) PCR-based analysis of the intergenic spacers of the Nor loci on the A genomes of *Triticum* diploids and polyploids. *Genome* 42: 116-128
- Sarkar P, Stebbins GL (1956) Morphological evidence concerning the origin of the B genome of wheat. *American Journal of Botany* 43: 297-304
- Schafer JF (1987) Rusts, smuts and powdery mildew. *Plant diseases* 13: 542-584
- Scharen AL, Briggie LW, Edwards SM (1964) Reaction of wheat varieties and species to cultures of powdery mildew fungus. *Plant Disease Reporter* 48: 262-263
- Scheel D (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 305-315
- Schmolke M (2004) Molekulargenetische Charakterisierung und Lokalisierung von Resistenzgenloci gegen Ährenfusariosen bei Winterweizen. Dissertation. Technische Universität München, Freising-Weihenstephan
- Sears ER (1954) The aneuploids of common wheat. *Research Bulletin* 572. University of Missouri Agricultural Experiment Station: 1-59
- Slovakova T, Svec M, Miklovicova M (2002) How many powdery mildew isolates do we need for virulence analysis? *Cereal rust and mildew bulletin* 30: [www.crpmb.org/](http://www.crpmb.org/)
- Srichumpa S, Brunner S, Keller B, Yahiaoui N (2005) Allelic Series of Four Powdery Mildew Resistance Genes at the *Pm2* Locus in Hexaploid Bread Wheat. *Plant Physiology* 139: 885-895
- Talbert LE, Blake NK, Storlie EW, Lavin M (1995) Variability in wheat based on low-copy DNA sequence comparisons. *Genome* 38: 951-958
- Talbert LE, Magyar GM, Lavin M, Blake TK, Moylan SL (1991) Molecular evidence of the origin of the s-derived genomes of polyploidy *Triticum* species. *American Journal of Botany* 78: 340-349

- The TT, McIntosh RA, Bennett FGA (1979) Cytogenetic studies in wheat. IX. Monosomic analyses, telocentric mapping and linkage relationships of genes *Sr21*, *Pm4*, and *Mle*. Australian Journal of Biology Science 32: 115-125
- Till BJ, Burtner C, Comai L, Henikoff S (2004) Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. Nucleic Acids Research 32: 2632-2641
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-4414
- Wiese MV (1987) Compendium of wheat diseases. The American Phytopathological Society, APS Press, St. Paul, 2<sup>nd</sup> ed, pp. 112
- William HM, Trethowan R, Crosby-Galvan EM (2007) Wheat breeding assisted by markers: CIMMYT's experience. Euphytica 157: 307-319
- Winzeler M, Mesterházy A, Park RF, Barto P, Csösz M, Goyeau H, Ittu M, Jones E, Löschenberger F, Manninger K, Pasquini M, Richter K, Rubiales D, Schachermayr G, Strzembicka A, Trotter M, Unger O, Vida G, Walther U (2000) Resistance of European winter wheat germplasm to leaf rust. Agronomie 20: 783-792
- Wolfe MS (1967) Physiologic specialization of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* in the United Kingdom, 1964-5. Transactions of the British Mycological Society 50: 631-640
- Yahiaoui N, Brunner S, Keller B (2006) Rapid generation of new powdery mildew resistance genes after wheat domestication. Plant Journal 47: 85-98.
- Yahiaoui N, Srichumpa P, Dudler R, Keller B (2004) Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. The Plant Journal 37: 528-538

- Yamaguchi T, Yamada A, Hong N, Ogawa T, Ishii T, Shibuya N (2000) Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: betaglucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *The Plant Cell* 12: 817-826
- Young ND (1990) Potential applications of map-based cloning to plant pathology. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37: 81-94
- Young ND (1996) QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 34: 479-501
- Zeller FJ, Kong L, Hartl L, Mohler V, Hsam SLK (2002) Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) 7. Gene *Pm29* in line Pova. *Euphytica* 123: 187-194
- Zeller FJ, Lutz J, Stephan U (1993) Chromosome location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L.) 1. *Mlk* and other alleles at the *Pm3* locus. *Euphytica* 68: 223-22
- Zhu Z, Zhou R, Kong X, Dong Y, Jia J (2005) Microsatellite markers linked to 2 powdery mildew resistance genes introgressed from *Triticum carthlicum* accession PS5 into common wheat. *Genome* 48: 585-590

# 7 Anhang

## 7.1 Ergebnisse der Inokulationsversuche

Tab. 31: Test der Linien auf bekannte Mehltauresistenzgene (Dr. Flath, JKL)

Sorten	Isolat	1	11	13	19	20	23	24	28	42	44	45	48	49	56	64	72	74	101	102	103	106	116	117	138	144	146	150	162	163	
Yxmins1,8*CC	Pm1	1-2	0	4	4	4	4	4	4	1	4	0	4	2-3	4	4	3-4	0	3	0	3	3-4	0	1-2	0	0	3-4	3	0	3-4	
Ulka8*CC	Pm2	0	3-4	4	4	4	4	4	0	4	3-4	0	0	3	4	3-4	3-4	1	0	0	4	3-4	0	0	4	4	4	3	3-4	3	
Ascotan8*CC	Pm3a	0	3	3	0	0	4	4	0	4	0	4	0	3-4	0	3-4	3-4	1	4	2-3	2-3	3-4	3	0	2-3	0	1-2	0	0	0	
Chul8*CC	Pm3b	0	3	0	0	1	2	4	0	4	0	4	0	3P	0	3-4	4	4	2-3	3-4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
Sonora8*CC	Pm3c	2	3-4	2-3	0	3-4	4	4	0	3-4	0	3-4	0	3-4	0	4	3	4	4	3	0	2-4	3	2	3-4	3	1-2	0	0	2	
Ralle1 SWI	Pm3d=Milk	0	3	0	2-3	4	0	0	0	3-4	3	0	0	4	4	3-4	0	4	0	1-2	0	0	0	2	2-3	0	3	0	0	0	
Wapli8*CC	Pm4a	3	2-3	3-4	4	4	3-4	4	3	3-4	4	4	4	4	3-4	4	3-4	4	4	2	3	4	3-4	4	3-4	3-4	4	3-4	3-4	3-4	
Ronos	Pm4b	2	4	4	4	4	4	4	4	0	4	0	0	4	4	4	4	4	4	1-2	4	3-4	4	0	4	4	4	3-4	4	4	
Rektor	Pm5	3-4	3-4	4	1-2	4	2	4	4	1-2	2	1-2	4	3-4	3-4	3-4	4	4	0	4	4	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	3	3	3	3	
Nik747	Pm6	2-3	2	3	3	3-4	4	3-4	3-4	2-3	3	2	2-3	3	2-3	2-3	2-3	3-4	1	3	4-2	1-2	3	3	3-4	3-4	3	Da?	3-4	2-3	
Disponert	Pm8	0	1-2	3-4	0	4	0	4	0	3	0	4	1-2	0	4	3	4	3-4	2	3-4	2	3-4	2-3	3	4-2	3-4	0	3-4	3	0	3
Amigo	Pm17	0	0	2-3	0	2	1-2	3	1	0	0	1-2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1-2	0
Normandi	Pm12,9	0	0	4	2-3	4	2-3	4	0	0	3-4	0	0	2-3	4	2	0	0	0	0	0	2	3-4	0	0	0	4	4	0	3	
Cadenza	Mlx	0	3	0	3	2-3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3-4	0	0	
Kadett	MiCo3	0	0	0	4	0	1-2	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0	0	
Hansaat	U(MiH2)	3-4	4	4	4	4	3	4	4	2	4	2-3	4	3-4	3	3-4	3	4	3-4	3	2	2	3-4	2-3	3-4	4	4	2-3	3-4	2	
Talart	MITa2	3	1-2	3-4	3	3-4	2	3-4	4	2-3	3-4	2-3	3-4	3-4	4	3	2	3-4	4	2-3	2-3	4	4	4	2-3	4	4	2-3	4	3	
Cortez	U	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vergas	U	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1-2	0	0	4	0	2	0	0	0	0	1-2	0	4	3	0	0	
M.Hurtsman	Pm2,6	0	0	3-4	4	4	4	3	0	4	1-2	0	0	2	0	0	1-2	0	0	0	4	0	0	0	2	4	4	3	3-4	2-3	
Romanus	Pm2,5,6	0	0	3-4	3-4	3-4	2-3	3	0	2	1	0	0	2	0	0	1-2	0	0	0	4	0	0	0	2	4	3-4	2-3	3	2-3	
Berwidur	U	0	0	3	0	1-2	3	2-3	0	0	0	0	1-2	0	0	0	1-2	0	0	0	0	0	1-2	0	0	3-4	0	0	0	0	
Mandub	U	0	0	0	0	0	2	3-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Atlantis	4b	1	4	3-4	4	0	4	4	4	4	4	0	1	0	0	3-4	2-3	3	4	0	3-4	4	3-4	0	0	4	4	4	4	4	
Cortez	U	0	0	1	0	0-3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Dobros	U	0	2	1-2	3-4	0	0	0-3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	2	0	0	0	0	2	0	2	3	0	2-3	
Kalistos	Ähnl. Pm3d	0	3-4	0	4	3-4	0	0	0	0	4	4	1	0	4	4	0	4	0	4	0	4	0	1-2	4	3-4	0	2-3	2	0	0
G939012	Pm5	3	3-4	4	0	4	0	3-4	4	0	0	1-2	3	2-3	3	3	0	2-3	4	0	3-4	4	2-3	4	3-4	4	3	3	4	3-4	
Classico	Pm2,4b,5	0	3-4	3-4	2-3	1-2	1-2	3-4	0	1-2	2	0	0	2	3	2-3	2	0	0	0	0	2-3	3-4	0	0	1-2	3	3	2-3	3	
90018,2,12	Pm2,5	0	4	3-4	3	4-3	4	0	2	2	0	0	0	4	4	4	4	0	0	0	0	3	3-4	0	0	4	4	2-3	3	3-4	
Dekan	Pm4b,5,6	0	2	3-4	1-2	0	2	3	2	1-2	0	0	0	0	2	0	2-3	4	0	1-2	3	0	0	0	2	3-4	3-4	2	2-3	2	
Convent	Pm5,6	4	3	4	0	4	2	2-3	2-3	0	2	1-2	4	3	1-2	0-3	2	4	0	2	4	0	2	4	3-4	3	4	3-4	4	2-3	
92422,5	Pm4b,5	0	3-4	3-4	1-2	4-1	0-3	4	4	2	1	0	0-3	0-3	4	2-3	3-4	0	0	0	3-4	2-3	0	0-3	3-4	4-4	4	4	3-4	3	
G939012	Pm5	3	3-4	4	0	4	0	4	0	0	1-2	3	2-3	3	0	2-3	3	0	4	0	3-4	4	2-3	4	3-4	4	3	3	4	3-4	

## 7.2 Chemikalienverzeichnis

### Extraktionspuffer

CTAB	Merck, Darmstadt
150 mM Tris	MP Biomedicals, Ohio
15 mM EDTA	MP Biomedicals, Ohio
1,05 M NaCl	ICN Biomedicals, Ohio
1,5 % Beta-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
Chloroform-Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
RNase	Roth, Karlsruhe

### Alkohollösung 1

76 % Ethanol	
0,2 M Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt

### Alkohollösung 2

76 % Ethanol	
10 mM Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt

### TE-Puffer

10 mM Tris, pH 8,0	MP Biomedicals, Ohio
1 mM EDTA, pH 8,0	MP Biomedicals, Ohio

### 1 %-iges Agarosegel (100 ml)

1 g SeaKem® LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
1 x TBE-Puffer 100 ml	
5 µl Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe

### 10 x TBE-Puffer

0,89 M Tris, pH 8,0	MP Biomedicals, Ohio
0,89 M Borsäure	MP Biomedicals, Ohio

**Restriktion/ Ligation**

ATP	Roth, Karlsruhe
NEB2-Puffer	New England BioLabs, Frankfurt
BSA	Amersham, Freiburg
Sse8387I- bzw. PstI-Adapter	Biomers, Ulm
MseI-Adapter	Biomers, Ulm
Sse8387I	Amersham, Freiburg
PstI	New England BioLabs, Frankfurt
MseI	New England BioLabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs, Frankfurt

**Prä-selektive Amplifikation**

10 x PCR Puffer	Eurogentec, Belgien
dNTPs	Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub>	Eurogentec, Belgien
Sse8387I-00 bzw. PstI-03 Primer	Biomers, Ulm
MseI-00/MseI-02 Primer	Biomers, Ulm
Sse8387I-NN/PstI-NNN Primer	Biomers, Ulm
MseI-NN/MseI-NNN Primer	Biomers, Ulm
Taq-Polymerase	Eurogentec, Belgien

**Mikrosatelliten-Analysen**

Primer	Biomers, Ulm
10 x PCR Puffer	Eurogentec, Belgien
dNTPs	Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub>	Eurogentec, Belgien
Taq-Polymerase	Eurogentec, Belgien

**10 x TBE Elektrophoresepuffer**

0,89 M Tris, pH 8,0	MP Biomedicals, Ohio
0,89 M Borsäure	MP Biomedicals, Ohio
0,5 M EDTA, pH 8,0	MP Biomedicals, Ohio

**Polyacrylamidgel 5 % (100ml)**

8,8 M Harnstoff	ICN Biomedicals, Ohio
12,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 40 %-ig	Roth, Karlsruhe
60 µl TEMED	Merck, Darmstadt
260 µl APS, 10 %-ig	Merck, Darmstadt

**Loading Dye für Polyacrylamidgele**

500 ml Formamid	Roth, Karlsruhe
150 mg Bromphenolblau	Pharmacia Biotech, Freiburg
150 mg Xylencyanol	Merck, Darmstadt
10 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0	MP Biomedicals, Ohio

**Loading Dye für Agarosegele**

5,04 g Glycerin	Roth, Karlsruhe
2 ml 50 x TBE	
Bromphenolblau	Pharmacia Biotech, Freiburg

**Klonierung**

TOPO TOP10-Cloningkit	Invitrogen
-----------------------	------------

**LB-Medium**

Hefeextrakt(5 g/l)	Merck, Darmstadt
Trypton (10 g/l)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (0,5 g/l)	Merck, Darmstadt

**Plasmidreinigung**

Nucleospin <sup>®</sup> Plasmid	Macharey-Nagel
---------------------------------	----------------

**Agarmedium für Sporeninokulation**

Benzimidazol (35 mg/l)	Merck, Darmstadt
Agar (6 g/l)	Merck, Darmstadt

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism Analyses
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphism
cDNA	Complimery Desoxyribonucleinacid
cM	Centimorgan
COS	Conserved Ortholog Set
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNMP	Dinukleotidmonophosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	Expressed Sequence Tag
LOD	Logarithm of Odds
LRR	Leucin Rich Repeats
MAP	Mitogen Aktiviertes Protein
MAS	Marker Assisted Selection
PCR	Polymerase Chain Reaction
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis
RGA	Resistance Genes Analouge
RILs	Recombinant Inbreed Lines
RNA	Ribonucleic Acid
RNAse	Ribonuklease
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism Analysis
SSR	Single Sequence Repeats

STS	Sequence Tagged Site
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TILLING	Targeting Induced Local Lesions IN Genomes
TRIS	Tis-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
YAC	Yeast Artificial Chromosome

---

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenzel für die Überlassung des Themas an der Technischen Universität München, im Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt bedanken.

Besonders bedanke ich mich bei Dr. Lorenz Hartl für die rege Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit, sowie für wertvolle Anregungen und hilfreiche Hinweise.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Kerstin Flath für die Durchführung von Tests mit Einsporisolaten.

Bei Dr. Günther Schweizer sowie Dr. Gerhard Zimmermann möchte ich mich für deren Unterstützung und ihr stets offenes Ohr bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Elena Madge-Pimentel sowie Petra Greim, da sie mich stets im Labor mit unterstützt haben.

Für die gute Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und viele interessante Gespräche möchte ich mich außerdem bei Alfred Barth, Jennifer Groth, Manuela Diethelm, Petra Hager, Josef Holzapfel, Alexandra Jestadt, Kerstin Krumnacker, Luise Logothetis, Veronika Maier, Sabine Mikolajewski, Rebecca Seidenberger und Susanne Wüllner bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts bedanke ich mich bei der GFP (Gesellschaft für Pflanzenzüchtung). Dabei gilt mein besonderer Dank der Saatzucht Strube und der Saatzucht Schweiger für die zur Verfügung gestellten Versuchsflächen, sowie deren technischer Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Astrid für die vielen Ratschläge und moralische Unterstützung in den letzten Jahren bedanken. Ohne sie wäre die Durchführung der Arbeit deutlich schwieriger gewesen.

---

# Lebenslauf

## Persönliches

Name	Bauer
Vorname	Christoph
Geburtstag	30.08.1976
Geburtsort	München
Familienstand	verheiratet

## Schulbildung

1983-1987	Grundschule, Ismaning
1987-1996	Werner-Heisenberg-Gymnasium, Garching

## Studium

1997-2002	Studium der Gartenbauwissenschaften an der Technischen Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan
-----------	--

Diplomarbeit am Lehrstuhl für Phytopathologie der Technischen Universität München „Induktion der Genexpression in Tabakblättern und -zellen nach Behandlung mit Elicitinen von *Phytophthora quercina*“

## Berufliche Tätigkeiten

2003-2006	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
seit 2006	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft am Institut für Landtechnik