Wissenschaftsförderung
der Deutschen Brauwirtschaft e.V.

BERICHT

zu Forschungsvorhaben B 80

Projekt-Nr.

☐ Zwischenbericht Nr.: _____

☑ Abschlußbericht

für den Zeitraum vom: Januar 2003 bis: Juni 2005

Thema:

”Entwicklung molekularer Selektionsmarker für Mehltauresistenz zur effektiven Unterstützung der Züchtung von Qualitätshopfen (*Humulus lupulus* L.)”

Forschungsstelle:

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
Hopfenforschungszentrum Hüll
Hüll 5 1/3, 85283 Wolnzach

Leiter der Forschungsstelle:

Dr. Peter Doleschel

Projektleiter:

Dr. Stefan Seefelder
Dr. Elisabeth Seigner

Verfasser des Berichtes:

Dr. Stefan Seefelder

Datum:

Hüll, 31.07.2005

Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben B 80

”Entwicklung molekularer Selektionsmarker für Mehltauresistenz zur effektiven Unterstützung der Züchtung von Qualitätshopfen (*Humulus lupulus* L.)”

Gefördert von der

Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
Hopfenforschungszentrum Hüll
Hüll 5 1/3, 85283 Wolnzach

Inhaltsverzeichnis:

1 Einleitung 4
1.1 Problemstellung 4
1.2 Ziel der Studie 6
2 Material und Methoden 7
2.1 Pflanzenmaterial 7
2.2 Methoden 7
2.2.1 Resistenzscreening und Spaltungsanalyse 7
2.2.2 Molekulare Analysen und Datenverrechnung 8
3 Ergebnisse und Diskussion 10
3.1 Restenzscreening und Spaltungsanalyse der Sämlingspopulationen 10
3.2 Molekulare Analysen 12
4 Zusammenfassung und Ausblick 20
5 Literatur 21

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Der Resistenzzüchtung gegen Schaderreger kommt zur Vermeidung von Ertrags- und Qualitätsverlusten sowie zur Verringerung des Fungizid- und Insektizideinsatzes eine steigende Bedeutung zu. Im allgemeinen wird die Kombination verschiedener Resistenzgene oder die Introgression neuer Resistenzgene aus nicht adaptierten Wildformen oder nah verwandten Arten durch sexuelle Rekombination erreicht. Das heißt einer Kreuzung von Elternlinien folgt eine phänotypische Selektion in der spaltenden Nachkommenschaft. Der Erfolg der Resistenzzüchtung beruht dabei ausschließlich auf der verlässlichen und wiederholbaren Durchführung von Resistenztests im Feld oder Gewächshaus im Hinblick auf das zu selektierende Merkmal. Da Hopfen jedoch von einer Vielzahl von Pathogenen befallen wird, die zudem i.d.R. eine relativ schnelle Adaption an die Resistenzen ihres Wirtes zeigen, ist die Züchtung resistenter Sorten eine sehr komplexe Aufgabe und das Auffinden gewünschter Rekombinanten mit Hilfe der phänotypischen Selektion in Feld und Gewächshaus stellt sehr hohe Anforderungen an die Züchtung.

Speziell der Echte Mehltau, verursacht durch das Pilzpathogen *Podosphaera humuli*, früher bezeichnet als *Sphaerotheca humuli,* ist bislang weltweit die wirtschaftlich bedeutendste Krankheit im Hopfenbau. Von diesem obligaten Parasiten können sowohl Triebe, Blätter, Blüten als auch Dolden des Hopfens befallen werden. Dies führt oft zu erheblichen Ertrags –und Qualitätseinbußen. Ab Mitte Mai zeigen sich die ersten Befallssymtome in Form weißer pustelförmiger, meist auf die Blattoberseite beschränkter Erhebungen. Der Infektionsdruck des Pathogens bleibt im allgemeinen bis Mitte Juli auf einem konstanten relativ niedrigen Niveau und steigt dann kontinuierlich bis Mitte August stark an. Speziell dieser Zeitraum ist für eine gute Ausbildung der Hopfendolden sehr entscheidend. Während zu diesem Zeitpunkt die dann schon älteren Hopfenlaubblätter nicht mehr so leicht infiziert werden können, besteht vor allem bei den noch jungen Dolden ein erhöhtes Infektionsrisiko. Auch die generell für eine Infektion wichtigen klimatischen Faktoren, trockenes Wetter in Kombination mit Feuchtigkeit in Form von Taubildung, begünstigen die Sporenbildung. In Abhängigkeit der jeweils angebauten Sorten sind vom Hopfenpflanzer im Laufe einer Vegetationsperiode somit bis zu vier kostenintensive Fungizidapplikationen erforderlich. Die Bekämpfung des Echten Mehltaus ist im Gegensatz zu den anderen Hopfenschädlingen recht kostenintensiv. So wurden hierfür in Deutschland in den letzten Jahren ca. 4,9 Mio. € pro Jahr aufgewendet.

Betrachtet man die im internationalen Hopfensortenspektrum vorhandenen Resistenzgene, lässt sich leider keine große Vielfalt von Resistenzgenen mit sehr guter

Wirksamkeit feststellen. Sie beschränkt sich nach wie vor fast ausschließlich auf die Resistenz der englischen Sorte Wye Target, die auf dem dominanten Hauptgen *R2* und den als „genetischen Hintergrund“ beschriebenen Minorgenen beruht (Darby und Gunn 1987). Von allen bislang bekannten dominanten Resistenzgenen (*R1-R7, RB*) (Darby et al. 1989; Neve 1991) wird neben dieser *R2*-Resistenz auch die *Rbu*-Resistenz der Sorte Buket und die Resistenz eines Wildhopfens aus der Eifel in den Hüller Genpool eingekreuzt. Erschwerend für eine dauerhafte Resistenz der Kulturpflanze Hopfen mag auch sein, dass eine Selektion durch andere Wirtspflanzen entfällt. Gegen diese stabilisierende Selektion durch einen anderen Wirt spricht auch die Tatsache, dass Hopfen überwiegend als Monokultur angebaut wird und sich aufgrund der genetischen Uniformität der Pflanzen (Klonvermehrung) ein erfolgreiches Pathogen sehr schnell (epidemisch) im gesamten Bestand ausbreiten kann.

Nur über den Züchtungsschwerpunkt „Krankheitsresistenz“ kann ein umweltverträglicher Hopfenbau langfristig gewährleistet werden. Die Einsparungen im Einsatz von Fungiziden bedeuten für die deutschen Hopfenpflanzer im internationalen Wettbewerb einen höheren betriebswirtschaftlichen Vorteil. Vor allem jedoch wird über die Forcierung der Mehltauresistenzzüchtung Sorge getragen, dass die hohe Qualität des deutschen Hopfen zur Bierproduktion auch weiterhin auf dem Weltmarkt seine Anerkennung findet. Nur über das Einkreuzen verschiedener Mehltauresistenzgene in das Zuchtmaterial ist gewährleistet, dass Deutschland auch weiterhin von Mehltauepidemien, wie sie zuletzt 1997 in den USA auftraten, verschont bleibt. Diese Mehltauepidemien können dann zu Totalausfällen in der Hopfenproduktion führen (Glendinning 1998). Von den bislang bekannten dominanten Resistenzgenen (*R1-R7, RB*) (Darby et al. 1989; Neve 1991) wird momentan verstärkt die *R2*-Resistenz der englischen Sorte Wye Target, die *Rbu*-Resistenz der Sorte Buket und die Resistenz eines Wildhopfens aus der Eifel in den Hüller Genpool eingekreuzt. Nur noch diese Resistenzgene versprechen in den deutschen Hopfenanbaugebieten bei allen bislang aufgetretenen Rassen von *Podosphaera humuli* Immunität. Auch über eine internationale Wildhopfensammlung am Hopfenforschungszentrum in Hüll wird dazu beigetragen, den Genpool mit neuen Resistenzgenen zu verstärken.

Aufgrund der ausgeprägten Heterozygotie, der Mischerbigkeit des Erbgutes, lassen sich beim Hopfen spezielle Zuchtziele schwerer verwirklichen als bei reinerbigen Kulturpflanzen wie z.B. Gerste und Weizen. Wurde letztendlich eine erwünschte Eigenschaft, wie z.B. Mehltauresistenz, in den Genpool eingekreuzt, besteht gleichzeitig bei weiteren Kreuzungen immer die Gefahr erwünschte Parameter wieder zu verlieren. Nur über immensen phänotypischen Selektionsaufwand konnten in der Hopfenzüchtung bislang Sämlinge mit mehreren erwünschten Merkmalen selektiert werden. Dies spiegelt

sich v.a. in der Anzahl der alljährlich zu selektierenden Pflanzen wieder. Von nahezu 100.000 Sämlingen werden jährlich die besten ausgewählt. Neben einer Vielzahl anderer Kulturpflanzen wie z.B. Apfel (Markussen et al. 1995), Gerste (Barua et al. 1993), Weizen (Hartl 1995) und Wein (Böhm und Zyprian 1998) finden PCR (polymerase chain reaction)- basierende Techniken auch in der Hüller Hopfenforschung bereits erfolgreich ihre Anwendung (Seefelder et. al. 2005b). Neben genetischen Diversitätsuntersuchungen zur Evaluierung der jeweiligen Kreuzungseltern werden auch geschlechtsspezifische DNA-Marker bereits erfolgreich eingesetzt.

1.2 Ziel der Studie

Ziel des Forschungsvorhabens B 80 " Entwicklung molekularer Selektionsmarker für Mehltauresistenz zur effektiven Unterstützung der Züchtung von Qualitätshopfen (*Humulus lupulus* L.)" war es, DNA-Marker für Mehltauresistenz zu identifizieren und in einer Chromosomenkarte zu kartieren. Der Schwerpunkt des vorliegenden Forschungsprojektes lag dabei auf der *R2*-Resistenz der Sorte Wye Target. Zum einen widersteht dieses Resistenzgen bislang dem gesamten für Deutschland repräsentativen Mehltaurassenspektrum und verspricht somit einen langfristigen Schutz. Zum anderen ist dieses R-Gen bereits über ca. 20 Jahre im Hüller Zuchtmaterial verankert. Zum Nachweis einer gelungenen Pyramidisierung mehrerer wirksamer Mehltauresistenzgene im Zuchtmaterial sollten in dem vorliegenden Projekt auch Marker für eine weitere wirkungsvolle Mehltauresistenz identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die Rbu-Resistenz der slowenischen Sorte Buket. Ein weiteres Ziel des vorliegenden Forschungsvorhabens war es, über DNA-Expressionsanalysen anhand der Sorte Wye Target genspezifische cDNA-AFLP-Marker zu entwickeln. Bei dieser im Gegensatz zur normalen AFLP Methodik aufwändigeren Technik besteht die Chance, Marker zu entwickeln, die direkt im Bereich des für die Resistenzausprägung verantwortlichen Gens liegen. Es besteht somit die Chance Marker zu identifizieren, die z.B. direkt für einen pilzpathogenen Inhaltsstoff oder für eine Zellwandverdickung codieren. Ein wichtiges Kriterium zur Forcierung dieser Arbeiten um das Wye Target-Gen war auch die Tatsache, dass bislang wichtige Vorarbeiten zur Untersuchung dieser scheinbar induzierten Resistenz sowohl phänotypisch (Goodwin et al. 1987) als auch molekular (Seefelder et al. 2005a) schon geleistet wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Im Laufe des Projektes wurden folgende Kartierpopulationen bearbeitet:

Buket (*RBu*) x 96/09/01
Buket (*RBu*) x 97/36/05
Buket (*RBu*) x 98/27/731 (*R2*)
Wye Target (*R2*) x 93/36/02
Wye Target (*R2*) x 96/09/01
84/008/24 (*R2*) x 98/044/049

2.2 Methoden

2.2.1 Resistenzscreening und Spaltungsanalyse

Zu Beginn des vorliegenden Projektes wurden spaltende Populationen erstellt. Diese Sämlingsnachkommen aus der Kreuzung eines Resistenzgendonors mit einem hoch mehltauanfälligen Elter bilden die Basis zur Identifizierung molekularer Mehltauresistenzmarker nach der „bulk segregant analysis“ (BSA) von Michelmore (et al. 1991). Je 120 Individuen pro Nachkommenschaft werden dann in anschließenden Infektionstests mit definierten Mehltaurassen untersucht. Hierzu wurde von 3 Wochen alten Sämlingen Blattmaterial entnommen und dieses in einem in vivo-Blattresistenztest untersucht. Bei diesem Mehltauresistenztestsystem mit abgeschnittenen Blättern (Seigner et al. 2002), das von EpiLogic und der LfL gemeinsam im Rahmen des Wifö-Forschungsprojektes B52b etabliert wurde, wurden mit einem definierten Mehltauisolat HU 2 mit charakterisierten Virulenzeigenschaften (*v3*- und *vB*-Virulenz; siehe Seigner et al. 2002) über eine Pressluftinjektion je 2 junge Blätter (= Blätter am 1. oder 2. Knoten) der einzelnen Sämlinge auf einem Agarmedium in Petrischalen inokuliert und nach ca. 10 Tagen auf Mehltaubefall hin bonitiert. Als Kontrollen wurden sowohl die Blätter der Kreuzungseltern als auch der Sorte Northern Brewer, die sich im Vorfeld für alle getesteten Einzelisolate als hochanfällig erwiesen hatte, mit dieser speziellen Mehltaurasse inokuliert. Zur Verifizierung der Resistenzbonituren wurde zum einen dieses Procedere nach ca. 2-3 Wochen mit einem weiteren jungen Blattpaar der einzelnen zu testenden Pflanzen wiederholt. Zum anderen wurden sämtliche Sämlinge im Gewächshaus in Hüll mit einem Mehltaurassengemisch, das der Virulenz der definierten Mehltaurasse im Labor-in-vivo-Test entspricht, nachgetestet. Somit wurde letztendlich

gewährleistet, dass mit keinen „falsch negativen“ (anfällige Pflanzen ohne Befallssymptome) weitergearbeitet wurde.

Als Grundlage für die späteren Expressionsanalysen wurde die Sorte Wye Target im Labor mit definierten Mehltaurassen beimpft. Verwendet wurde das für Wye Target nicht-virulente Isolat E8 (*v1-, v3, vB*-Virulenz; Seigner et al., 2002) und das für Wye Target virulente englische Isolat E10 aus England (*v1-, v2-, v3-, v5-, vB*-Virulenz; aktuelle Untersuchungen Frühjahr 2005). Diese Arbeiten waren wesentlich früher geplant, verzögerten sich jedoch, da das ursprünglich vorhandene Isolat E9 (*v1-, v2-, v3*-Virulenz) ab 2003 nachlassende Virulenz aufwies und es bis 2005 dauerte bis ein neues voll v2-virulentes Mehltauisolat zur Verfügung stand. Aufbauend auf den mikroskopischen Analysen einer induzierten Wye Target-Mehltauinfektion (Godwin et al. 1987) wurde als Infektionsdauer ein Zeitraum von 11 Tagen gewählt. Es wurde nach 1, 4, 7 und 11 Tagen nach Infektionsbeginn Blattmaterial entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für eine spätere RNA-Isolation bei –80 C aufbewahrt.

2.2.2 Molekulare Analysen und Datenverrechnung

Von den Pflanzen der Kartierpopulationen und den Kreuzungseltern wurden vor der Mehltaubeimpfung je ca. 150 mg Blattmaterial entnommen, gefriergetrocknet und in einer Schwingmühle bei maximaler Schüttelfrequenz pulverisiert. Nach einer modifizierten Methode nach Doyle und Doyle (1990) wurde aus den Proben die genomische DNA extrahiert, deren Konzentration photometrisch bestimmt und für die AFLP-Reaktionen eingestellt. Für die Identifizierung der Resistenzmarker wurden pro Sämlingspopulation zwei DNA-Pools gebildet. Ein Pool bestand aus der DNA von je 10 eindeutig mehltauresistenten Pflanzen, der andere aus der DNA 10 extrem anfälliger Individuen. Diese Pools wurden, in der Hoffnung auf ein unterschiedliches Bandenmuster, mit der AFLP-Methode gegeneinander gescreent. Wurden dann bei den Pools Unterschiede in Form einer speziellen DNA-Bande identifiziert, konnte dazu übergegangen werden, die einzelnen Poolindividuen und später die gesamte Population auf das Vorhandensein oder Fehlen des Markers zu testen.

Die Methode der „Amplified Fragment Length Polymorphism“ (AFLP) wurde von Zabeau und Vos (1993) patentiert und ihre Anwendung für pflanzliche Genome 1995 zum ersten Mal veröffentlicht (Vos et al. 1995). Die nicht radioaktive AFLP-Analyse erfolgte nach einem bereits bei Hopfen etablierten Protokoll (Seefelder et al. 2000 b). Sie beruht auf dem kombinierten Einsatz von Restriktionsenzymen und der PCR-Reaktion. Hierzu wird die DNA zunächst mit einem häufig schneidenden *(Mse*I) und einem selten schneidenden Enzym *(EcoRI)* verdaut. Mit der Kombination beider Enzyme entstehen

Restriktionsfragmente, die für die späteren PCR-Reaktionen eine optimale Länge (< 500 bp) aufweisen. Nach der enzymatischen Hydrolyse der DNA werden schnittstellenspezifische Adaptoren an die Fragmente ligiert, welche die Vorlage für spezifische Primer in der darauf folgenden PCR-Reaktion darstellen. Die spezifischen Primer besitzen überhängende Basen am 3´-Ende, welche in das Restriktionsfragment hineinragen. Ausgang für die AFLP-Reaktionen ist also ein mit Enzymen geschnittenes Hopfengenom mit überwiegend unbekannter Basenabfolge. Die Enden dieser Bruchstücke (= bekannte Schnittstellensequenz der Enzyme) ermöglichen den Primerdesign für eine selektive Amplifizierung. Durch eine Markierung der Primer mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein können alle unter Beteiligung dieser Primer amplifizierten Fragmente nach einer elektrophoretischen Auftrennung mit einem Laser-Fluoreszenzdetektor visualisiert werden und auf Polymorphismen ausgewertet werden.
Polymorphismen (unterschiedliche Bandenmuster) bedeuten Unterschiede in der DNA-Sequenz. Wenn die Nachkommen einer Kreuzung (resistenter x anfälliger Elter) Polymorphismen aufzeigen und vorausgesetzt sie unterschieden sich phänotypisch nur in dem Merkmal „resistent – anfällig“, so ist dies ein Hinweis auf einen molekularen Marker für ein Resistenzgen. Treten anfällige Pflanzen auf, welche den Marker für Resistenz zeigen bzw. resistente Pflanzen ohne Marker, ist die Ursache genetische Rekombination. Während der Meiose werden zwischen den Elternchromosomen einzelne Abschnitte ausgetauscht. Anhand dieser rekombinanten Pflanzen konnte über eine anschließende Kopplungsanalyse mit der Kosambi-Funktion (Kosambi 1944) oder der Computersoftware JoinMap 3.0 (Van Ooijen and Voorrips 2001) der genetische Abstand (cM) der DNA-Marker vom jeweiligen Resistenzlocus errechnen werden. Eine genetische Distanz von 5 cM bedeutet, dass bei 5% der Nachkommenschaft ein Kopplungsbruch vorliegt, also Resistenzmarker und Resistenzgen während der Meiose durch ein Rekombinationsereignis voneinander getrennt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Restenzscreening und Spaltungsanalyse der Sämlingspopulationen

Über eine statistisch hinterlegte phänotypische Spaltungsanalyse (Tab. 1) wurde anhand der untersuchten Kreuzungsnachkommen zunächst geprüft, ob die Resistenzausprägung der jeweils untersuchten Resistenzgene vorwiegend von einem monogen vererbten dominanten R-Gen gesteuert wird, oder ob mehrere (= polygen) vererbte Nebengene dafür verantwortlich sind. Resistente Pflanzen wurden den Befallsklassen 1 (mehltaufrei) und 2, anfällige Pflanzen den Befallsklassen 3, 4 und 5 zugeordnet. Der χ^2-Test auf Übereinstimmung des beobachteten mit dem theoretisch erwarteten Spaltungsverhältnis (resistent : anfällig) erfolgte auf der Basis der Nullhypothese, dass ein dominantes qualitatives Gen oder ein Block sehr eng gekoppelter quantitativer Gene für die Ausprägung der Resistenz verantwortlich ist. Es wurde eine signifikante Abweichung von 5 % toleriert. Bei der Identifizierung von Markern für die Resistenzgene *R2* und *Rbu* war es das erste Mal, dass die Boniturdaten auf dem von EpiLogic und der LfL in der Petrischale etablierten Mehltauinfektions- und Prüfsystem basierten. Dieses Resistenztestsystem mit definierten Mehltauisolaten liefert viel zuverlässigere und aussagekräftigere Boniturdaten für Kartierpopulationen als die ausschließlich im Gewächshaus mit Mischisolaten durchgeführten Tests. Dieses ebenfalls von der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft geförderte Projekt B 52 b „Erarbeitung eines miniaturisierten in vivo-Resistenztestsystems und Differenzierung verschiedener Pathotypen des Echten Mehltaus (*Sphaerotheca humuli*) bei Hopfen zur Beschleunigung der Mehltauresistenzzüchtung“ hat einen enormen Stellenwert sowohl für die klassische Züchtung als auch als Grundlage für molekulare Arbeiten. Es waren somit gute Voraussetzungen für die Erarbeitung eng mit den Resistenzgenen gekoppelter Marker gegeben. Um möglichst genaue Aussagen zur Qualität potentieller Resistenzmarker treffen zu können, wurden verschiedene Kreuzungen mit ein und demselben Resistenzträger durchgeführt. Zur Verifizierung von möglichen *R2*-Markern wurde noch eine Kreuzung mit dem weiblichen Zuchtstamm 84/008/24, einem mehltauresistenten Nachkommen der Sorte Wye Target durchgeführt.
Von den ca. 6-8 Wochen alten, im Gewächshaus aus Samen herangezogenen Hopfenpflänzchen wurde jeweils das jüngste, voll entfaltete Blattpaar künstlich mit Mehltau in der Petrischale inokuliert. Nach 8 Tagen Inkubation (22°C; 12-stündiger Licht-/ Dunkelrhythmus) wurden die Blätter der Sämlinge im Vergleich zur Kontrolle (hoch anfälliges, zu 100 % mit Mehltau befallenes Blatt der Sorte „Northern Brewer“) bonitiert und als resistent (0-20 % Befall) bzw. anfällig (30-100 % Befall) eingestuft.

Kreuzungsnachkommen aus:	Anzahl d. Sämlinge (F1-Pop.)	Phänotyp resistent: anfällig		erw.	χ^{2-}	Mt-Isolat
Buket (RBu) x 96/09/01	**120**	**57**	**63**	**1:1**	**0.30**	**HU2**
Buket (RBu) x 97/36/05	**160**	**84**	**76**	**1:1**	**0.40**	**HU2**
Buket (RBu) x 98/27/731 (*R2*)	**131**	**103**	**28**	**3:1**	**0.92**	**HU2+E9**
Wye Target (*R2*) x 93/36/02	**120**	**67**	**53**	**1:1**	**1.63**	**HU2**
Wye Target (*R2*) x 96/09/01	**120**	**58**	**62**	**1:1**	**0.13**	**HU2**
84/008/24 (*R2*) x 98/044/049	**120**	**67**	**53**	**1:1**	**1.63**	**HU2**

Tab. 1: Spaltungsanalyse der untersuchten Mehltauresistenzkreuzungen

Der Test wurde nach ca. 3 Wochen nochmals wiederholt. Sowohl bei den *Rbu*- als auch den *R2*-Kartierpopulationen fanden sich resistente und anfällige Pflanzen zu 98% in den Befallsklassen 1 und 5. Intermediäre Bonituren mit den Befallsklassen 2, 3 und 4 waren eher selten. Als Inokulum für alle Sämlingspopulationen diente das Mehltauisolat HU2 mit definierten Virulenzeigenschaften, wodurch eine klare Differenzierung zwischen mehltauanfälligen und resistenten Sämlingen durchgeführt werden konnte. Zur klaren Unterscheidung der Wirkung zweier verschiedener Resistenzen in der Kreuzung Buket (*RBu*) x 98/27/731 (*R2*) wurde zusätzlich mit dem bis zu diesem Zeitpunkt noch virulenten Isolat E9 gescreent. Aufgrund der deutlichen 3:1 Spaltung zwischen resistenten und anfälligen Pflanzen konnte das Wirken zweier dominanter Hauptgene bestätigt werden. Zur Verifizierung der in der Petrischale gewonnenen Mehltaubonituren, wurden die Sämlinge nach ihrer Testung mit dem definiertem Mehltauisolat HU2 im Gewächshaus in Hüll nachgetestet. Aufgrund der Tatsache, dass dieses Isolat aus einer Mehltauinfektion im Hüller Zuchtgarten gewonnen wurde und auch im Gewächshaus Virulenzen aus Hüller Mehltauatämmen zum Test eingesetzt werden, stimmten die Labor-Bonituren mit den Hüller Gewächshausbonituren zu 100 % überein.

Die Infektionstests zur Expressionsanalyse konnten erst im Juni 2005 erfolgreich durchgeführt werden, da ab 2003 das *R2*-virulente Isolat E9, mit dem Wye Target infiziert werden sollte, ab 2003 seine 100%ige Virulenz verloren hat. Ähnliche Phänomene mit länger in Kultur genommenen Mehltauisolaten werden auch bei anderen Fruchtarten wie Weizen und Gerste beschrieben (Felsenstein 1991). Die für die Erhaltung der Virulenz wichtigen Überdauerungsformen wie Kleistothecien werden im Labor nicht gebildet. Das Mehltauisolat E9 wurde seit 1999 im Labor erhalten. Trotz intensiver Bemühungen zu

Kollegen aus England und den USA ist es erst 2005 gelungen, als Ersatz für E9 das ebenfalls v2-virulente Isolat E10 auf Target zu kultivieren. Um die Unterschiede auf RNA-Ebene zwischen einer erfolgten und abgewehrten Pilzinfektion zu erfassen, wurde Wye Target zusätzlich mit dem für Target nicht virulenten Isolat E8 infiziert. Als Kontrolle wurde zusammen mit Wye Target auch die hochanfällige Sorte Northern Brewer mit den beiden Isolaten infiziert. Unmittelbar vor der Infektion - ein, vier, sieben Tage und abschließend 11 Tage nach erfolgter Infektion wurden ca. 100 mg Blattmaterial für die spätere RNA-Isolation entnommen. Um direkt nach der Blattentnahme die genau zu diesem Zeitpunkt aktiven Gene zu detektieren, wurden die Blätter in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80C aufbewahrt. Mit der RNA-Isolation könnte nun begonnen werden.

3.2 Molekulare Analysen

Aufbauend auf den Resistenzbonituren der Sämlinge wurde damit begonnen, DNA-Pools von jeweils zehn resistenten oder anfälligen Individuen aus den verschiedenen Kartierpopulationen zu bilden. Diese DNA-Pools wurden mit insgesamt 240 AFLP-Primerkombinationen auf Unterschiede im Bandenmuster gescreent. Bislang zeigten sich drei vielversprechende *RBu*-Marker, die bei fast allen resistenten Sämlingen aus allen drei Buket-Kreuzungen wiederzufinden waren. Je nach Anzahl der falschpositiven Individuen (Fehlen oder Vorhandensein eines DNA-Fragmentes, was nicht mit der Resistenzbonitur übereinstimmt) in den verschiedenen Kreuzungen variierte die Trefferquote für die einzelnen Resistenzmarker. Die Übereinstimmung zwischen phänotypischer und genotypischer (DNA-Marker-Bande) Mehltauresistenz liegt beim Buket-Marker RBu-279 zwischen 92 und 97%, bei RBu-284 zwischen 91,7 und 92,5% und bei RBu-319 zwischen 92,5 und 94,5%. Dies entspricht einem Abstand der Buket-Marker vom Buket-Mehltauresistenzgen zwischen 3,0 und 8,3 cM (Centi Morgan).

Auch für das *R2*-Gen aus Wye Target konnten mehrere eng gekoppelte Resistenzmarker erarbeitet werden und über mehrere Kartierpopulationen erfolgreich verifiziert werden. In einem Abstand zwischen 1,7 und 2,6 cM konnten sechs sehr eng am Resistenzlocus gekoppelte Marker identifiziert werden. Als weiterer *R2*-Resistenzmarker konnte der Mikrosatellit EL22 identifiziert und ebenfalls verifiziert werden. Bei einer abschließenden Kartierung zeigte dieser einen Abstand von 4,4 cM vom *R2*-Gen.

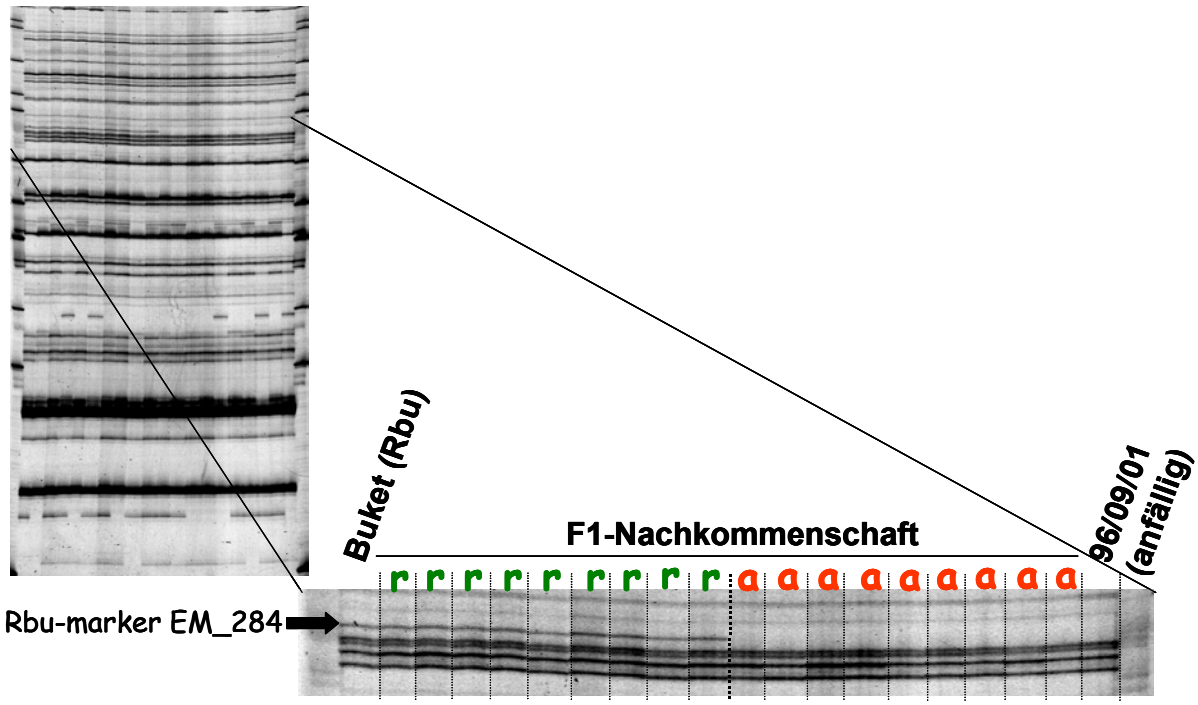


Abb. 1: AFLP-Marker EM_284 zur Identifizierung des *Rbu*-Mehltauresistenzgens

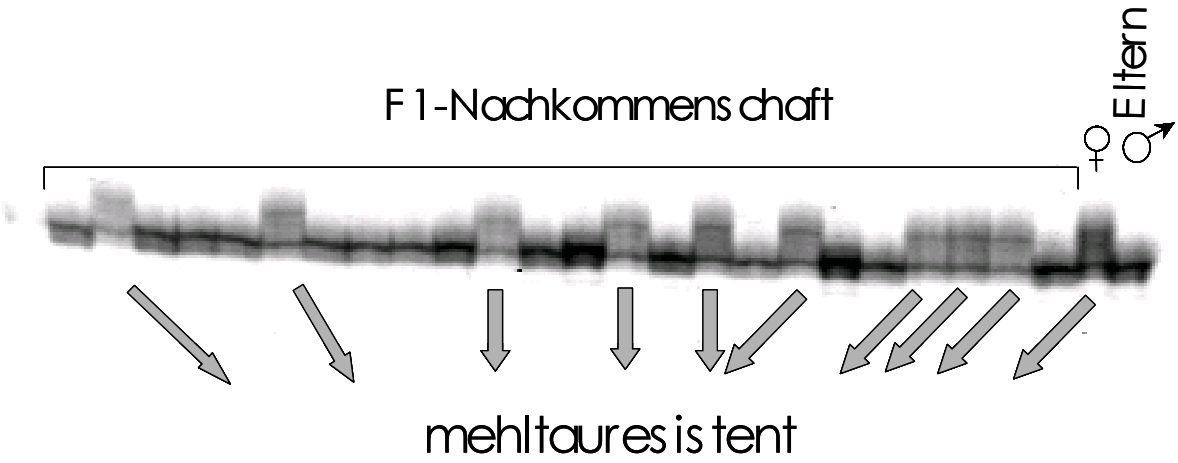


Abb. 2: Selektion mehltauresistenter Sämlinge mit dem Mikrosatelliten EL22

In der Nachkommenschaft der Kreuzung Buket (*RBu*) x 98/27/731(*R2*) konnten bei der molekularen Analyse Individuen identifiziert werden, die keinen Resistenzmarker tragen, die nur einen *RBu*-Marker oder einen *R2*-Marker zeigen, oder die eine Kombination von *RBu*- und *R2*-Marker aufweisen. Dieser erstmalig gelungene Nachweis der molekularen Selektion doppeltresistenter Nachkommen stellt einen entscheidenden Meilenstein zur markergestützten Selektion in der Resistenzzüchtung beim Hopfen dar.

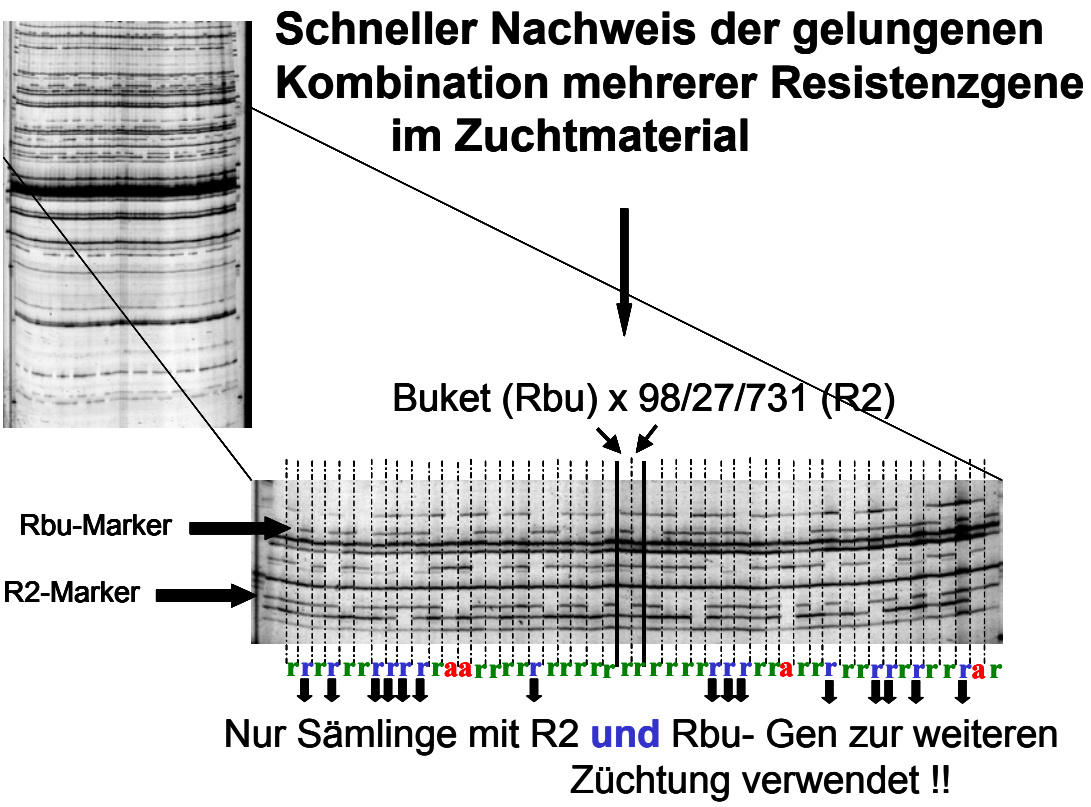


Abb. 3: Selektion doppelresistenter Sämlinge der Kreuzung Buket (*Rbu*) x 98/27/731 (*R2*)

Im Laufe des vorliegenden Projektes konnte erstmals für das Genom des Hopfens ein Resistenzgen in einer Kopplungskarte (Chromosomenkarte) kartiert werden. Es handelt sich hierbei um das Mehltauresistenzgen *R2* der englischen Sorte Wye Target. Aufgrund der Tatsache, dass sich Hopfen wie auch viele andere Fremdbefruchter unter den Kulturpflanzen durch eine stark ausgeprägte Heterozygotie auszeichnet, war es nötig, für beide Geschlechter separate Karten zu erstellen. Hierzu wurde ausgehend von der Kreuzung der Zuchtstämme 84/08/24 (*R2*-resistent) x 98/44/49 (anfällig) eine 120 Individuen umfassende sog. „two way pseudotestcross"-Kartierpopulation geschaffen. Diese Art von Kartierpopulation beschreibt eine Kreuzung zweier heterozygoter Eltern (Malipaard et al. 1997). Diese Art von Kartierpopulationen hat sich bei anderen von starker Heterozygotie geprägten Fruchtarten wie z.B. dem Wein oder Apfel bewährt.

Zur Erstellung der Chromosomenkarte konnte anhand der DNA der 104 weiblichen und 16 männlichen Kreuzungsnachkommen mit insgesamt 91 AFLP-Primerkombinationen 620 polymorphe DNA-Fragmente gewonnen werden. Davon zeigten 93 Marker (15%) gestörte Spaltung. Gestörte Spaltung bedeutet eine statistisch untermauerte Abweichung von den zu erwartenden 1:1 und 3:1 Spaltungsverhältnissen. Ein Spaltungsverhältnis von 1:1 bedeutet, dass das ausgewertete polymorphe Fragment bei einem Elternteil und bei 50% der Nachkommen zu finden ist. Bei einer 3:1 Spaltung hingegen kommt die unter-

suchte polymorphe Bande bei beiden Eltern und 75% der Nachkommenschaft vor. Aufgrund der ohnehin starken Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses von weiblichen und männlichen Pflanzen (104:16) wie dies generell beim Hopfen üblich ist, wurden auch diese „gestörten“ Marker in die Chromosomenkartenverrechnung mit einbezogen. Bei anderen Fruchtarten mit ebenso starker Selektion auf das weibliche Geschlecht und einer gleichen Abweichung vom theoretischen Verhältnis 50:50 (weiblich:männlich) wird dies genauso praktiziert. Von 549 Fragmenten mit einer 1:1 Spaltung konnten 414 dem weiblichen Elter und 135 dem männlichen Elter zugeordnet werden. 97 Marker wurden von beiden Eltern vererbt und zeigten eine 3:1 Spaltung. Insgesamt wurden zudem auch 17 Mikrosatelliten (Brady et al., 1996; Hadonou et al. 2005) in die Verrechnung mit einbezogen. Mit der Mapping-Software Joinmap 3.0 wurden unter stringenten Bedingungen 620 AFLP, 18 Mikrosatelliten (SSRs) und die phänotypischen Resistenzdaten verrechnet. Insgesamt konnten 485 Marker 17 Kopplungsgruppen (Chromosomen) zugeordnet werden (Abb. 4). 321 Marker konnten insgesamt neun weiblichen Kopplungsgruppen und 165 Marker acht männlichen Kopplungsgruppen zugeordnet werden. Eine Übersicht der Verrechnungsdaten zeigt Tab. 2. Auf der mit 101 cM größten weiblichen Kopplungsgruppe (1w) konnte das *R2*-Mehltauresistenzgen lokalisiert werden (Abb. 5). Dies ist die erste Kartierung eines Resistenzgenes für das Hopfengenom.

	weiblich	männlich	Gesamt
Individuen	104	16	120
resistent	49	4	53
anfällig	55	12	67
Marker/Gesamt AFLPs/SSRs	321 303/18	165 150/15	485 453/33
Kopplungsgruppen	9	8	17
Kartengröße/ cM	320,6	237,4	558
Durchschnittlicher Markerabstand	0,99	1,43	1,15
„Brückenmarker“			22

Tab. 2: Daten aus der Kartierung der *R2*-Mehltauresistenz

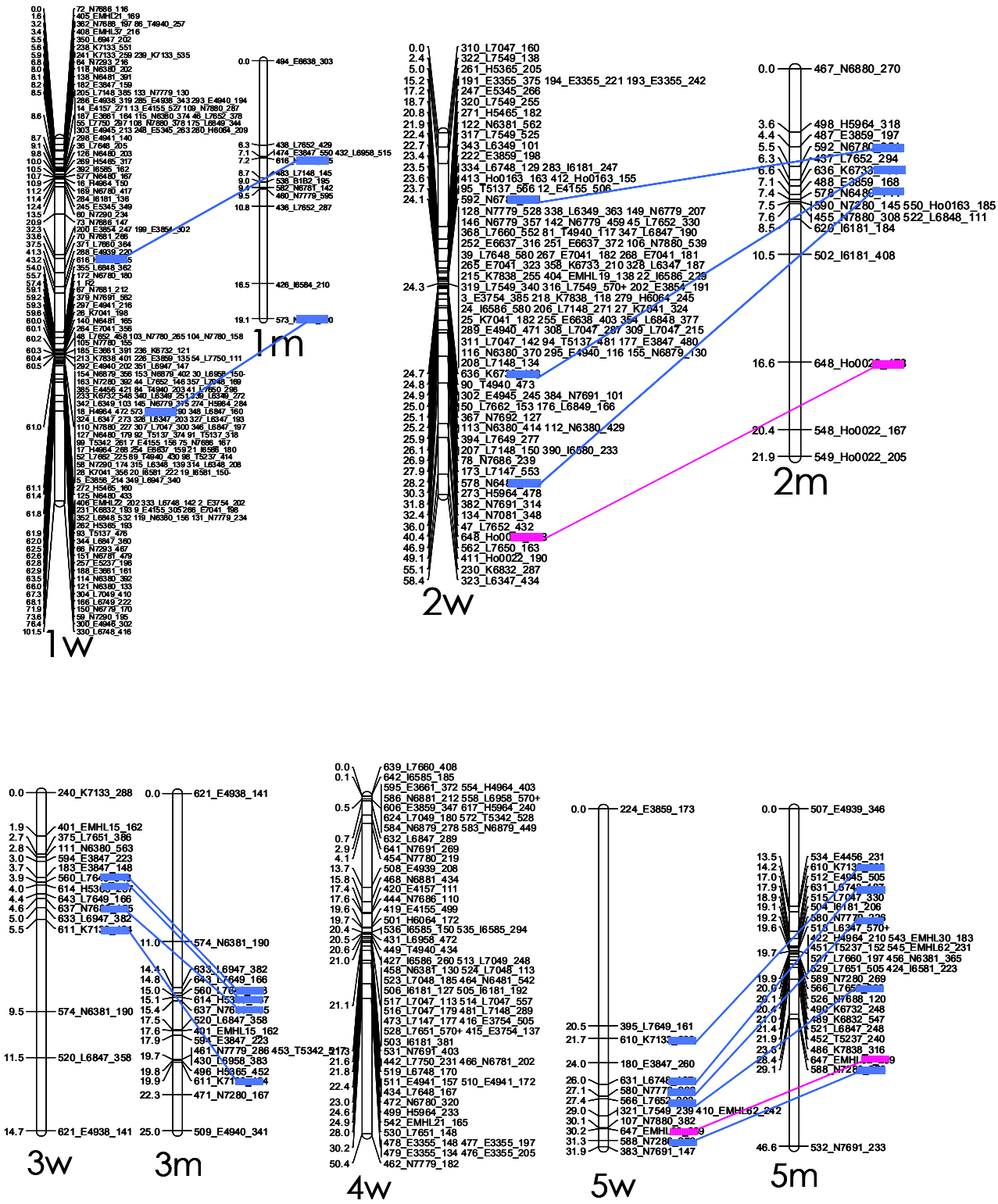
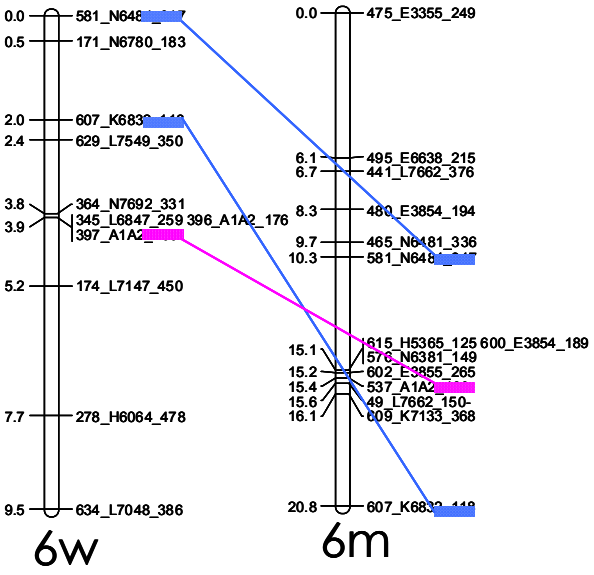
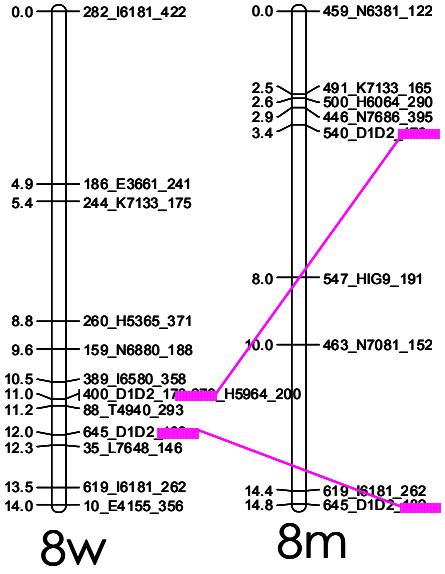
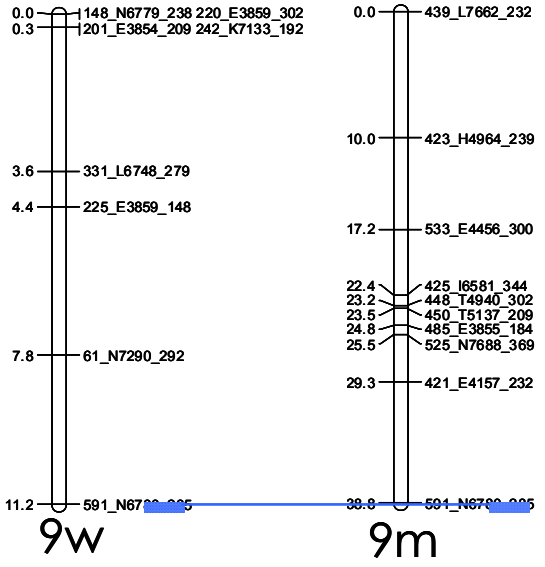


Abb. 4: Chromosomenkarte der Mehltauresistenzkreuzung 84/08/24 (*R2*) x 98/44/49







Fortsetzung von Abb. 4:
Chromosomenkarte der Mehltauresistenzkreuzung 84/08/24 (*R2*) x 98/44/49

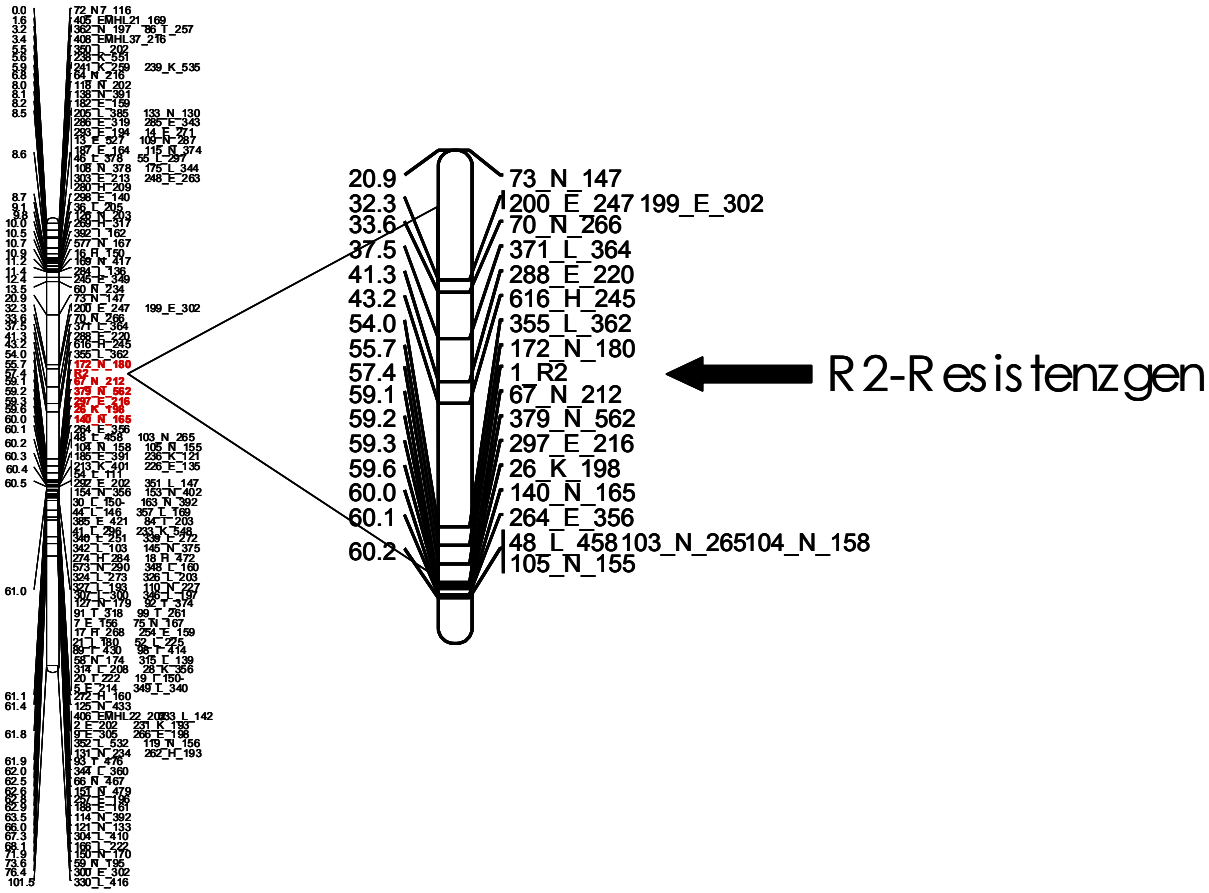


Abb. 5: Erste Kartierung eines Resistenzgenes auf dem Hopfengenom

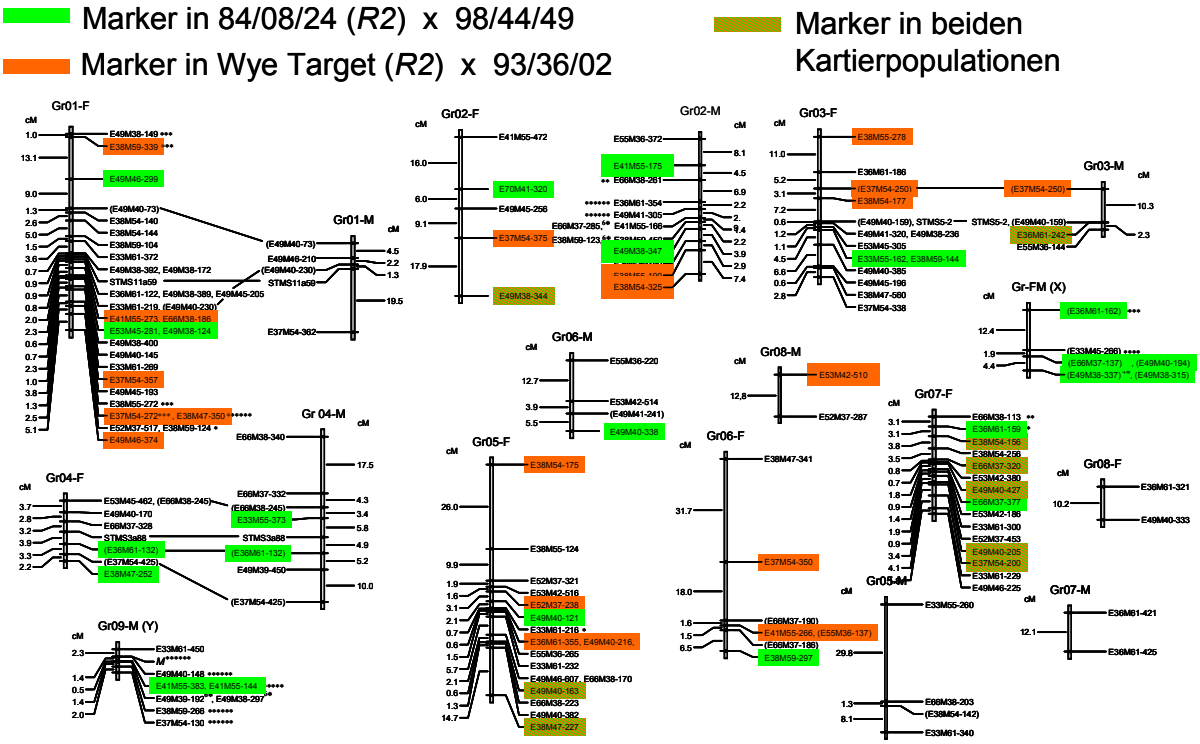


Abb. 6: Verifizierung von Markern in der ersten Hopfengenomkarte

In einem weiteren Schritt konnten viele Marker der beiden Kartierpopulationen 84/08/24 x 98/44/49 und Target x 93/36/02 in der ersten Chromosomenkarte des Hopfens (Seefelder et al. 2000a) wiedergefunden werden (Abb. 6). Dies ist insofern wichtig, dass auf diesen Karten alle weiteren nachfolgenden Kartierungsarbeiten beim Hopfen basieren werden.

Im Zuge des vorliegenden Projektes konnte auch damit begonnen werden, anhand von 255 weiblichen und männlichen Zuchtstämmen die identifizierten Mehltauresistenzmarker zu verifizieren. Aufgrund der Tatsache dass mit der Einkreuzung der *R2*-Resistenz in den Hüller Genpool schon vor über 20 Jahren begonnen wurde und die Resistenzeinstufung dieser Zuchtstämme bislang nur auf Gewächshaus– und Freilandinfektionen beruhte, zeigt sich diese Verifizierung als sehr arbeitsaufwändig. Zum Beispiel wurde der Zuchtstamm 93/10/1 (Abb.7), ein männlicher Nachkomme der Sorte Wye Target, über Jahre hinweg aufgrund seines Resistenzverhaltens als Träger des *R2*-Mehltauresistenzgens klassifiziert. Bei der nun erfolgten Verifizierung der identifizierten Mehltauresistenzmarker wurde in diesem Zuchtstamm jedoch kein Resistenzmarker gefunden. Betrachtet man die Spaltungsanalyse der Nachkommenschaft dieses Zuchtstammes mit der mehltauanfälligen Sorte Aquila (Abb. 7) sind jedoch nur 5% resistente Nachkommen zu verzeichnen. Besäße 93/10/1 ein dominantes Hauptgen müsste dieses, den Mendelschen Regeln folgend, zu 50% auf die Nachkommenschaft vererbt werden. In den anderen in der Abbildung aufgeführten Beispielen lässt sich die Effizienz der erarbeiteten Resistenzmarker ebenso gut verfolgen.

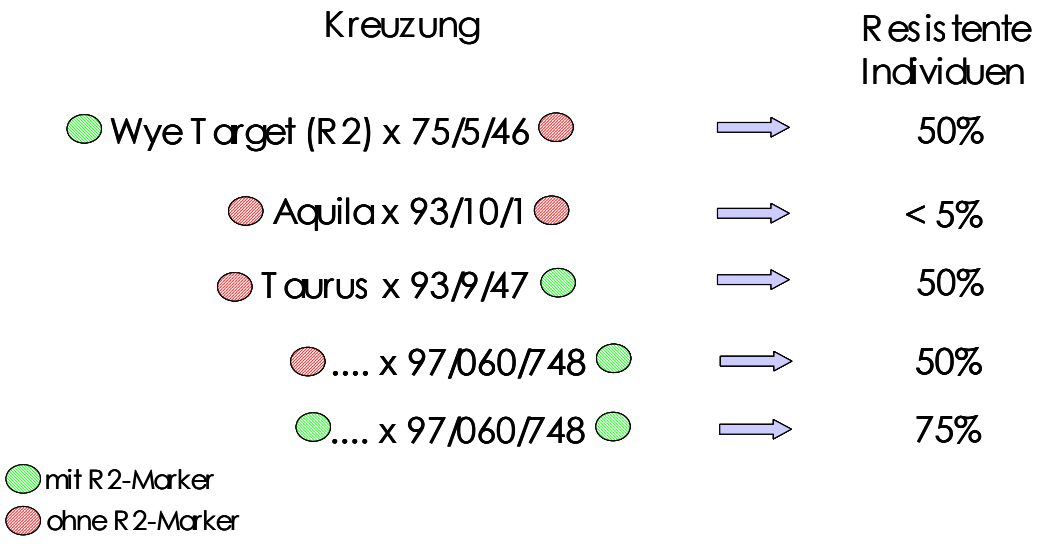


Abb. 7: Verifizierung „mehltauresistenter“ Zuchtstämme mit molekularen Markern in Kombination mit einer phänotypischen Spaltungsanalyse

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Einführung von Techniken der molekularen Diagnostik in der Hopfenforschung zeigt sich als vielversprechender Ansatz und ist wie bei vielen anderen Fruchtarten in einer modernen Pflanzenzüchtung nicht mehr wegzudenken. Neben der Klärung von Fragen zur Sortenreinheit, der Bestimmung der genetischen Diversität des Hopfengenoms, der schnellen und sicheren molekularen Geschlechtsbestimmung und der quantitativen Abschätzung eines bestimmten Cohumulongehaltes konnten nun im Zuge dieses Forschungsprojektes molekulare Marker für Mehltauresistenz entwickelt werden. Es waren dies zum einen Marker für das *Rbu*-Mehltauresistenzgen der Sorte Buket als auch sehr eng gekoppelte Marker für das bislang in den deutschen Anbaugebieten hocheffiziente *R2*-Gen der Sorte Wye Target. Die besten Marker mit einem Abstand von 1,7 cM vom Resistenzgen bedeuten in ihrer Praxisanwendung eine theoretische „Trefferquote“ von 98,3 %. Alle im vorliegenden Projekt identifizierten Mehltauresistenzmarker konnten in eigens für diesen Zweck kreierten „Referenzpopulationen“ bezüglich ihrer Gültigkeit verifiziert werden. Über Kartierungsarbeiten ist es in dem vorliegenden Forschungsprojekt auch erstmalig im Bereich der Hopfenforschung gelungen, ein Resistenzgen auf dem Hopfengenom zu kartieren. Über diese Arbeiten kann die Resistenzzüchtung bei Hopfen künftig sicherer, schneller und v.a. unabhängiger von Umwelteinflüssen gestaltet werden. Aufgrund des Absinkens der Virulenz des im Labor über einen längeren Zeitraum kultivierten *R2*-virulenten Mehltauisolates E9 konnten wichtige Vorarbeiten zur Expressionsanalyse erst vor kurzem erfolgreich abgeschlossen werden. Darüber hinaus stellt sich die Verifizierung der *R2*-Mehltauresistenzmarker im Zuchtmaterial als sehr arbeits– und kostenintensiv dar und konnte noch nicht vollständig durchgeführt werden. Geplant ist daher die Fortsetzung dieser Arbeiten, um wichtige weibliche und männliche Zuchtstämme auf das Vorhandensein oder Fehlen der *R2*-Resistenz-Marker im Zusammenhang mit dem Resistenzverhalten zu überprüfen. Des weiteren soll über Spaltungsanalysen der *R2*-Resistenz mehr Basiswissen über die komplexen Interaktionen zwischen *R2*-Hauptgen und möglichen resistenzunterstützenden Nebengenen geschaffen werden.

5 Literatur

Barua, U.M., Chalmers, K.J., Hackett, C.A., Thomas, W.T.B., Powell, W. und Waugh, R. (1993): Identification of RAPD markers linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near-isogenic lines and bulked segregant analysis. Heredity 71:177-184.

Böhm, A. und Zyprian, E. (1998): RAPD marker in grapevine (*Vitis* spp.) similar to plant retrotransposons. Plant Cell Reports 17: 415-421.

Brady, J.L., Scott, N.S. and Thomas, M.R. 1996: DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS). Euphytica, 91, 277-284.

Darby, P. und Gunn R.E. (1987): Report on a joint programme of research and development work on hops carried out by the Institute of Horticultural Research and the Agricultural Development and Advisory Service (ed. R. E. Gunn)

Darby, P., Godwin, J.R. und Mansfield, J.W. (1989): The assessment of partial resistance to powdery mildew disease in hops. Plant Pathology 38: 219-225.

Doyle, J.J. und Doyle, J.L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 1990, 12: 13-15.

Felsenstein, G. F. (1991): Virulenz und Fungizidsensitivität des Weizenmehltaus, *Erysiphe graminis* DC.f.sp. *tritici* Marchal, in Europa, Dissertation der technischen Universität München.

Glendinning, P. (1998): Report to the National Hop Association of England Ltd. About the conference on powdery mildew in the USA: 1-4.

Godwin,J.R., J.W. Mansfield and P. Darby (1987): Microscopial studies of resistance to powdery mildew disease in the hop cultivar Wye Target, Plant Pathology 36, 21-32.

Hadonou, A. M., Walden, R. & Darby, P. 2004:Isolation and characterization of polymorphic microsatellites for assessment of genetic variation of hops (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Ecology Notes* 4 (2), 280-282.

Hartl, L. (1995): Identifizierung und Lokalisierung molekularer Marker für Mehltauresistenzgene bei Weizen (*Triticum aestivum* L.). Diss. Fak. Landw. und Gartenbau der TU München.

Maliepaard, C., Jansen, J. und Van Ooijen, J.W. (1997): Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for application. Genet. Res. 70: 237.

Markussen, T., Krüger, J., Schmidt, H. und Dunemann, F. (1995): Identification of PCR-based markers linked to powdery-mildew-resistance gene Pl_1 from *Malus robusta* in cultivated apple. Plant Breeding 114: 530-534.

Michelmore, R.W., Paran, I. und Kesseli, R.V. (1991): Identification of markers linked to the disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1212-1216.

Neve, R.A. (1991): Hops. Chapman and Hall, London.

Polley, A., Seigner, E. und Ganal, M.W. (1997): Identification of sex in hop *(Humulus lupulus)* using molecular markers. Genome 40: 357-361.

Seefelder, S., Ehrmaier, H., Schweizer, G. und Seigner, E. (2000a): Male and female genetic linkage map of hops, *Humulus lupulus*. Plant Breeding 119, 249-255.

Seefelder, S., Ehrmaier, H., Schweizer, G. und Seigner, E. (2000 b): Genetic diversity and phylogenetic relationships among accessions of hop, *Humulus lupulus*, as determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data. Plant Breeding 119, 257-263.

Seefelder, S., Lutz; A. und Seigner E. (2005a): Mapping of a powdery mildew resistance gene in hop (*Humulus lupulus* L.) Proceedings of the Scientific Commission of the IHGC; George, SA, 31-35. ISSN 1814-2192.

Seefelder, S., Kammhuber, K., Lutz, A., Engelhard B. und E. Seigner (2005b): Genome analysis in hops- a powerful method for improving an essential raw material for brewing; Proceedings of the 30th EBC 14-19.05.05, Prag.

Seigner, E., Seefelder, S. and Felsenstein, F. (2002): Untersuchungen zum Virulenzspektrum des Echten Mehltaus bei Hopfen (*Sphaerotheca humuli*) und zur Wirksamkeit rassen-spezifischer Resistenzgene. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 54: 147-151.

Van Ooijen, J.W. and Voorrips, R.E. (2001): JoinMap version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, The Netherlands.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. und Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414.

Zabeau, M. und Vos, P. (1993): Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 92402629.7 (Publ no. 0534858 A1).