

# Resistenzzüchtung bei Nutzpflanzen

**Christian Jung**

[c.jung@plantbreeding.uni-kiel.de](mailto:c.jung@plantbreeding.uni-kiel.de)  
<http://www.plantbreeding.uni-kiel.de>



**Plant Breeding  
Institute**



# Schaderreger und epidemiologische Grundlagen

# Pflanzliche Krankheitserreger und Schädlinge

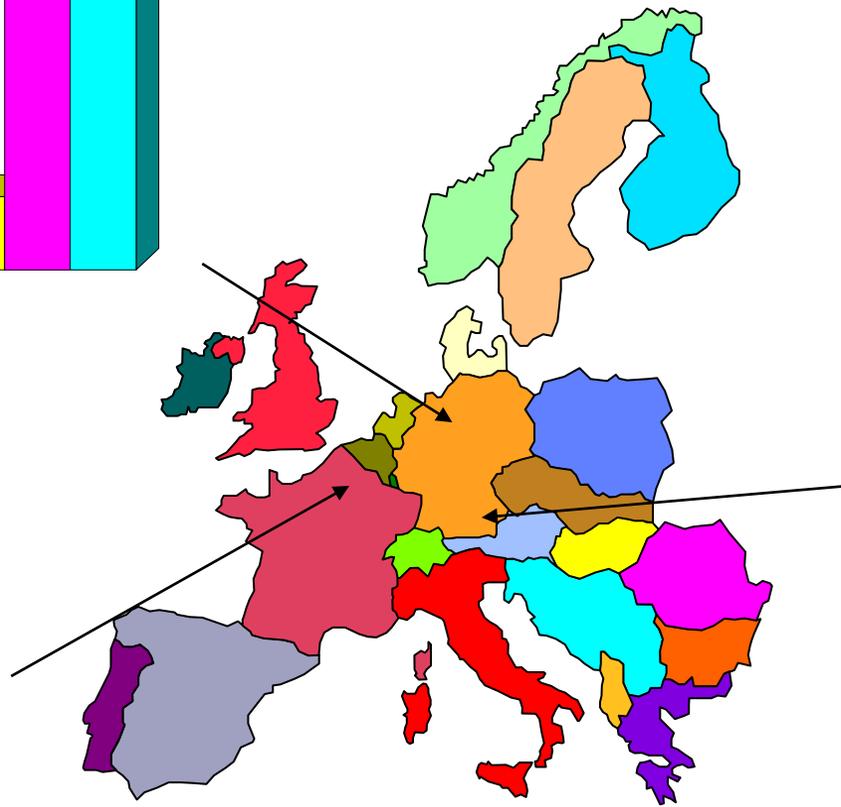
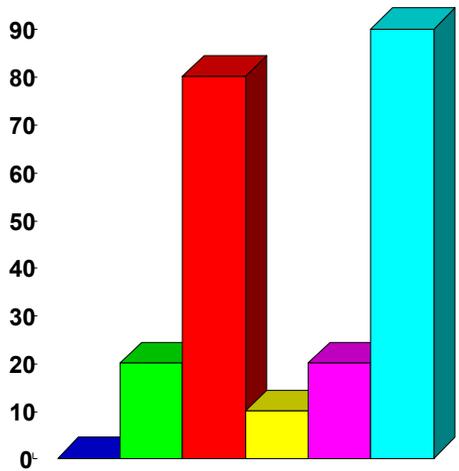
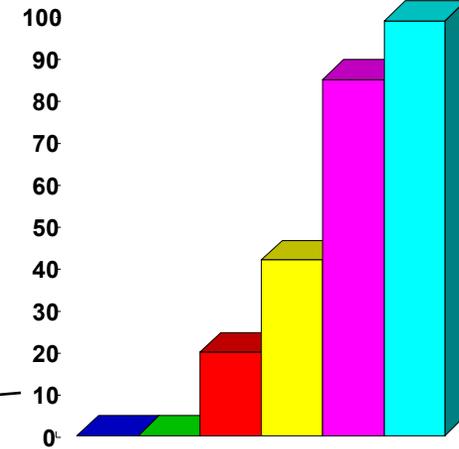
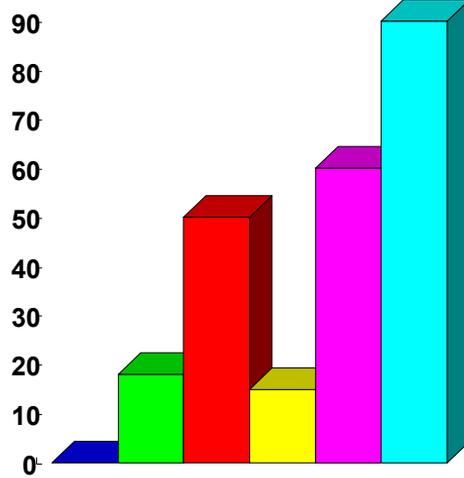
- luftbürtige Pilze
- bodenbürtige Pilze
- Oomyceten
- Protisten
- Phytoplasmen
- Bakterien
- Viren, Viroide
- Nematoden
- Insekten



<https://www.planet-wissen.de/natur/mikroorganismen/>

# relative Häufigkeiten von Mehltaurassen, die bestimmte Resistenzen in der Gerste durchbrechen

- Mla9
- Mlv
- Mla12
- Mik
- Mla6
- Mlg



# Epidemiologie bei monogener und polygener Resistenz

Ausprägung der Resistenz (%):

100

90

80

70

60

50

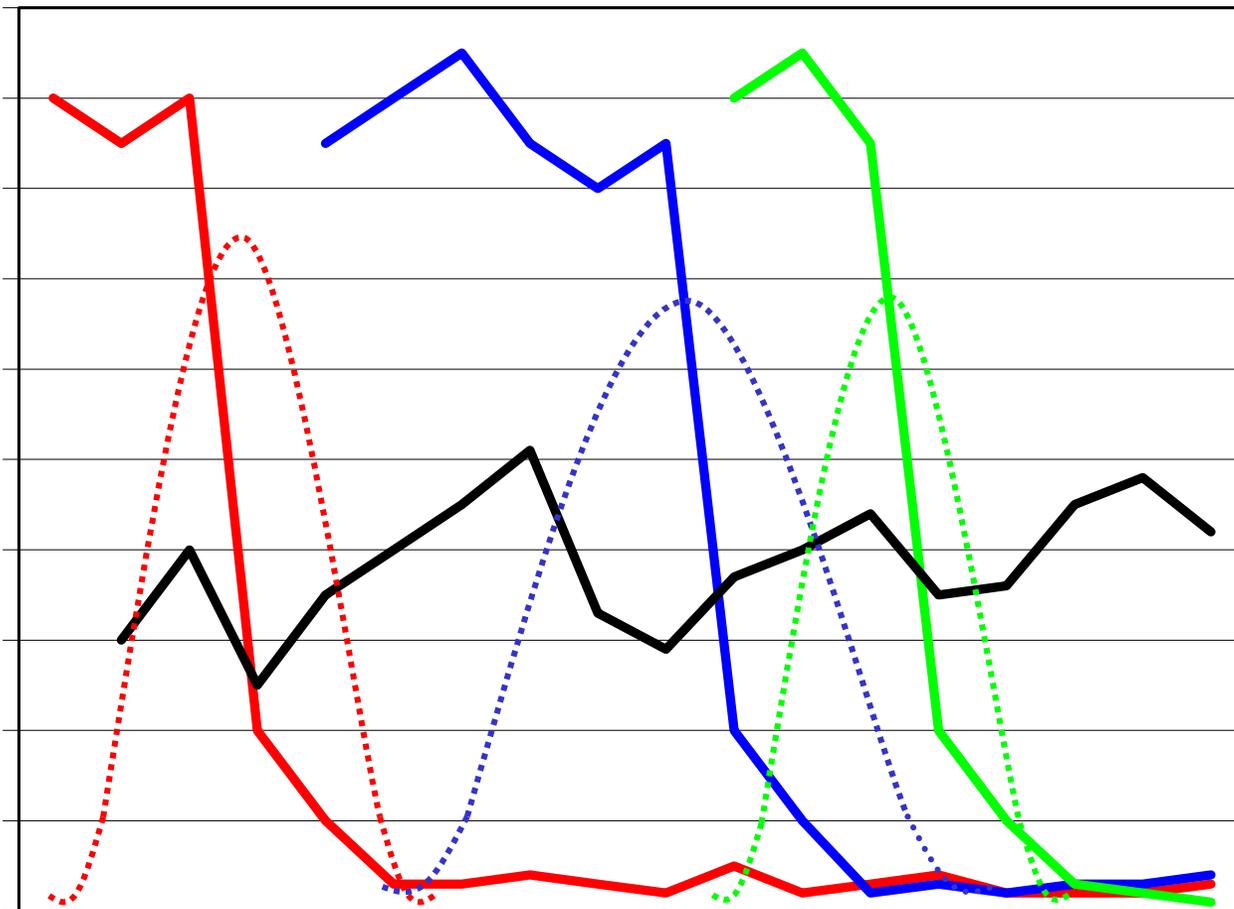
40

30

20

10

0



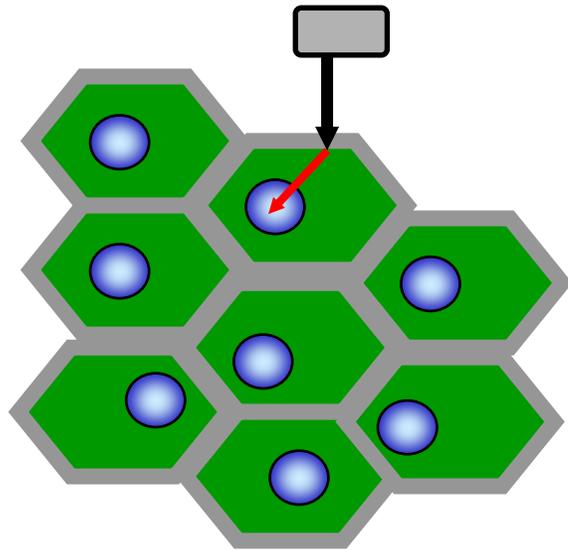
Häufigkeit der Avirulenzgene:  
 avr 1  
 avr 2  
 avr 3

R1  
 R2  
 R3  
 horizontale R.

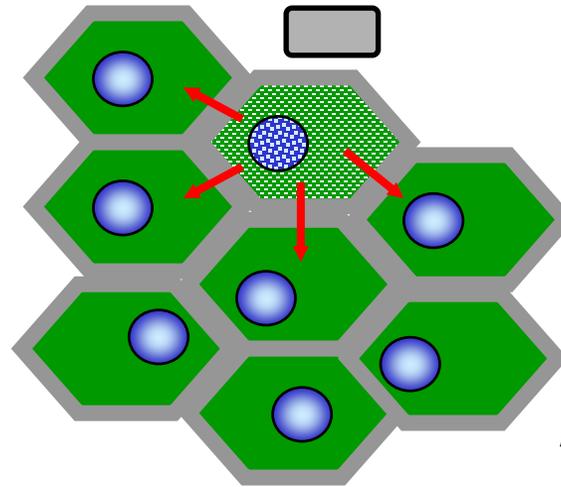
quantitativ: horizontal  
 qualitativ: vertikal

# Molekulare und genetische Grundlagen der Resistenzzüchtung

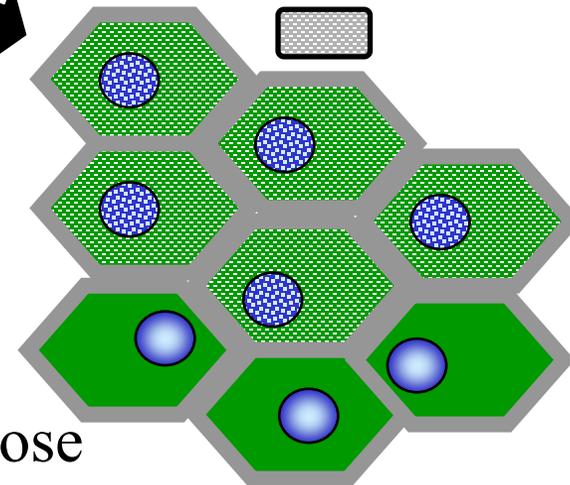
# Pathogen-induzierter Zelltod



Pathogen-Erkennung  
Signalweitergabe  
Aktivierung des Letalgens durch  
Pathogen-induzierbaren Promotor

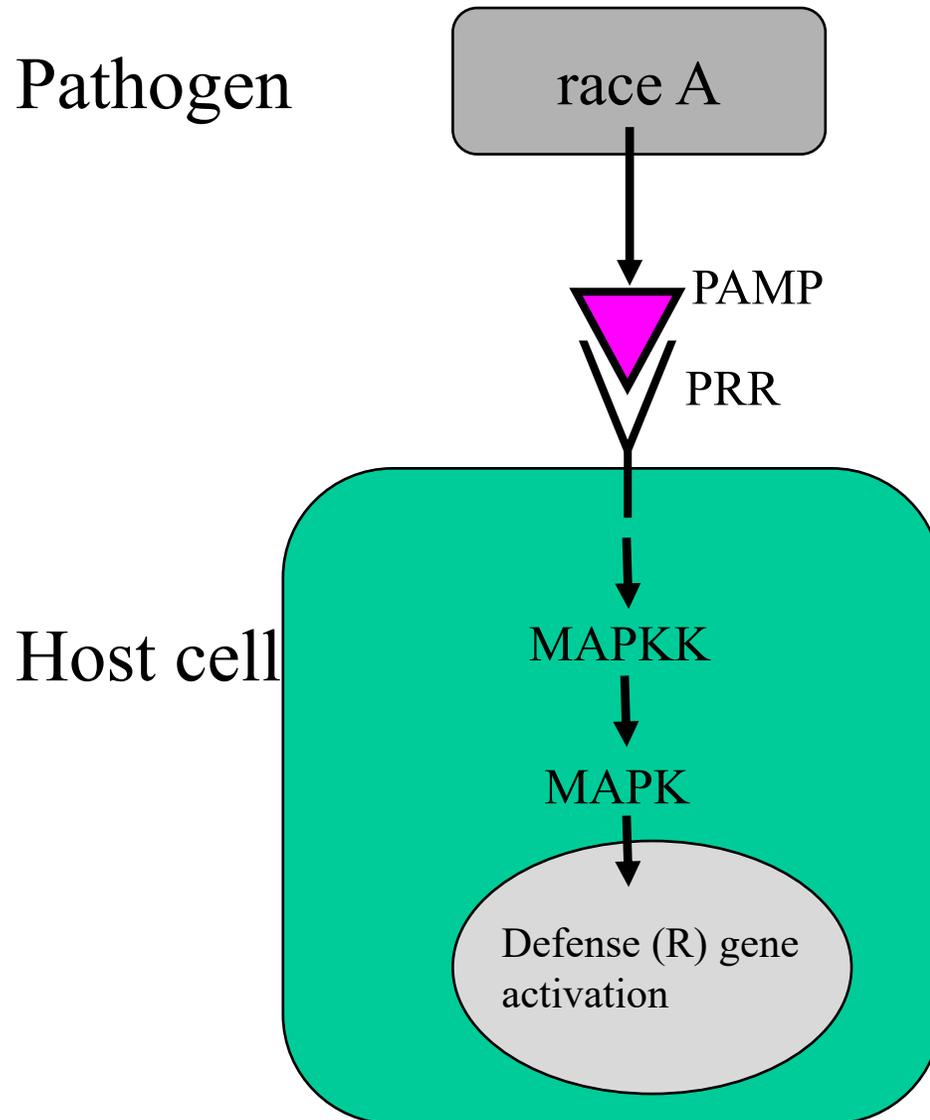


lokaler Zelltod  
Signalweitergabe



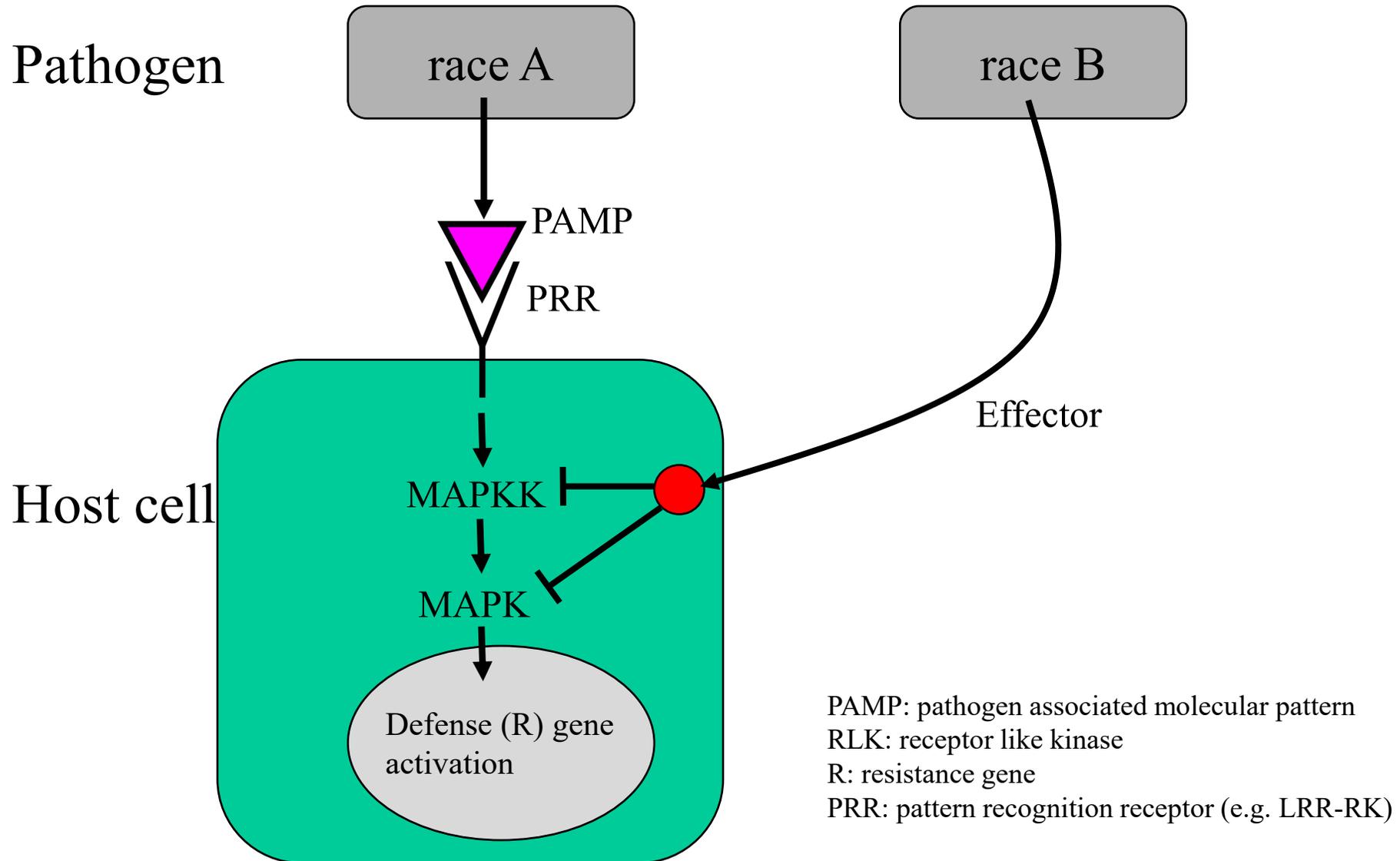
Nekrose

# PAMP triggered plant immunity



PAMP: pathogen associated molecular pattern  
RLK: receptor like kinase  
R: resistance gene  
PRR: pattern recognition receptor (e.g. LRR-RK)  
MAPK: mitogen-activated protein kinases  
MAPKK: MAPK kinase

# Effector triggered susceptibility



# Wichtige Begriffe aus der Resistenzzüchtung

## Resistenz

- Fähigkeit der Pflanze, Wachstum und Entwicklung eines Schaderregers nach dem Kontakt zu reduzieren (Antibiosis)

## unspezifische Resistenzmechanismen

- z.B. mechanische Barrieren verhindern den Befall mit Insekten (z.B. behaarte Blätter)

## Toleranz

- Wirtspflanze zeigt trotz Befall keinen wesentlichen Leistungsabfall

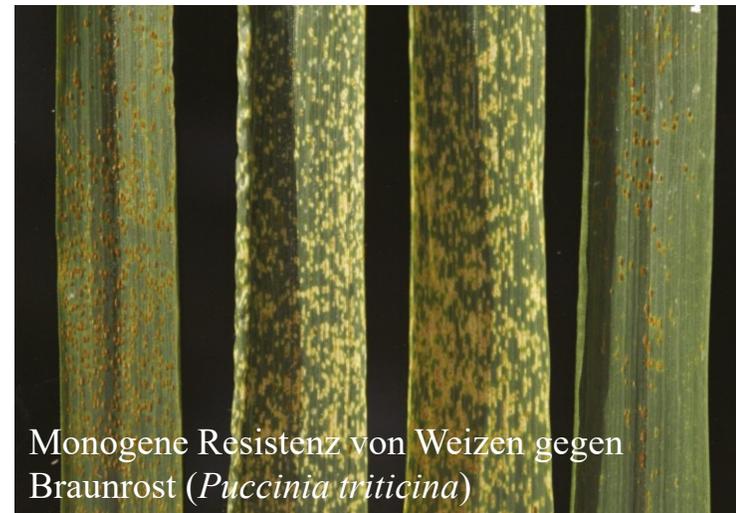
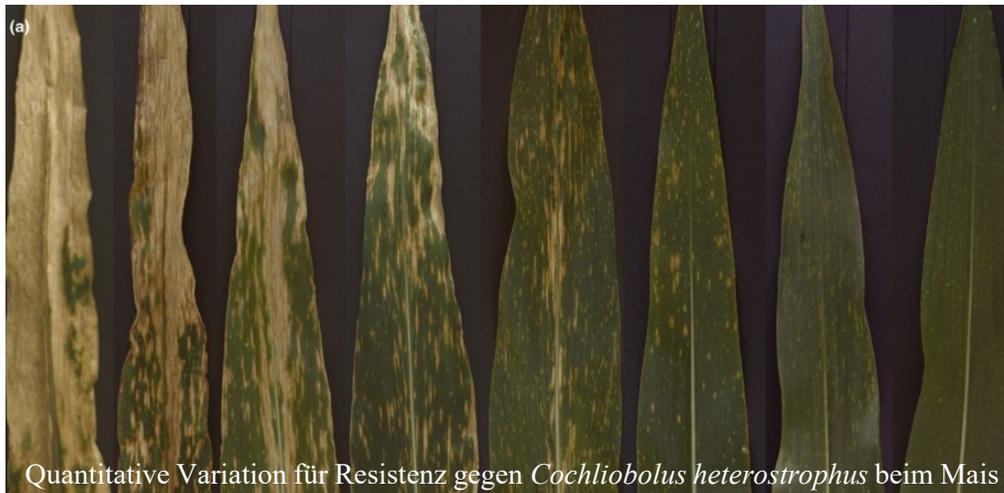
# Monogene Resistenz vs. polygene Krankheits- und Schädlingsresistenz

## Monogene Resistenz

- rassenspezifische Resistenz
- dem Resistenzgene entspricht ein Effektorgen auf Seiten des Erregers (2 Phasen der molekularen Wirt-Parasit Interaktion: 1. Erkennung, 2. Abwehr)
- erstreckt sich von völliger Immunität bis völliger Anfälligkeit (+/- Reaktion).
- Züchterisch leicht zu handhaben
- Keine oder geringe Genotyp-Umweltinteraktion
- Oft mit Hypersensitivität verbunden

## Polygene Resistenz

- keine Pathotypenspezifität: gleichmäßige Resistenz gegen alle Rassen, nicht Rassen-spezifisch (aber es gibt Ausnahmen)
- größere Umweltvariabilität,
- breitere Resistenzgrundlage, die von den Änderungen des Rassenspektrums unabhängig ist und dadurch die Möglichkeit eines Resistenzverlustes ausschließt
- Wirkung beruht eher auf einer Behinderung des Pathogenwachstums als auf Hypersensitivität (nicht durch +/- Reaktion gekennzeichnet)
- Züchterisch schwer zu handhaben
- Mittlere bis hohe Genotyp-Umweltinteraktion
- quantitative Resistenzen sind dauerhafter als qualitative Resistenzen



Nelson R, Wiesner-Hanks T, Wisser R, Balint-Kurti P (2017) Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nature Reviews Genetics* 19:21.

Poland, J. A., et al. (2009/1). "Shades of gray: the world of quantitative disease resistance." *Trends in Plant Science* 14(1): 21-29.

# Resistenzzüchtung

# Genotypische und phänotypische Bestimmung von Resistenz

In vitro Test, Test mit isoliertem Toxin

- Meist erfolglos, weil Resistenz von Einzelzellen gegen Toxin nicht mit Resistenz der ganzen Pflanzen gegen den Erreger korreliert

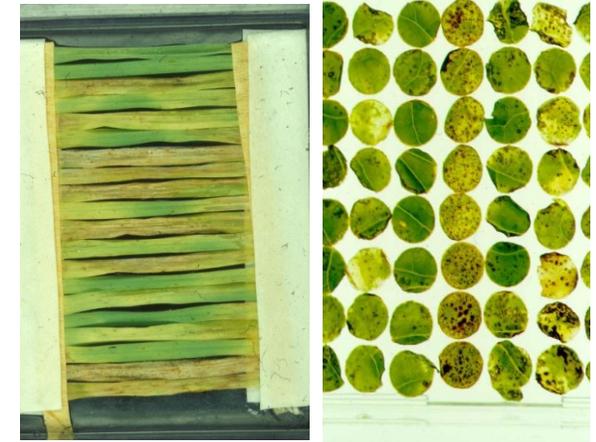
Blattsegmenttests

- wichtige Methode zur Resistenzbestimmung oder Rassenbestimmung bei biotrophen Erregern (zB Rost, Mehltau)
- abgetrennte Pflanzenteile testen, halbsteriler Test mit einzelnen Blättern oder Blattscheiben (Pilzresistenz)
- Bsp. Roggen Braunrost, Prüfung mit Blattscheiben auf Benzimidazol Agar (durch Zufügen von Benzimidazol lassen sich Blätter länger grün halten Hormonwirkung)

Test in Gewächshaus oder Klimakammer

- definiertes Inokulum
- Rassen durch Testersets differenzieren
- Kann in sehr frühen Generationen beginnen, kann an Einzelpflanzen durchgeführt werden, aber bei quantitativer Vererbung meist erfolglos
- Beispiele: Nematodenresistenz, Virusresistenz im Gewächshaus testen nach mechanischer Inokulation oder nach Standardinfektion mit übertragenden Insekten,

Marker gestützte/genomische Selektion = genotypische Selektion

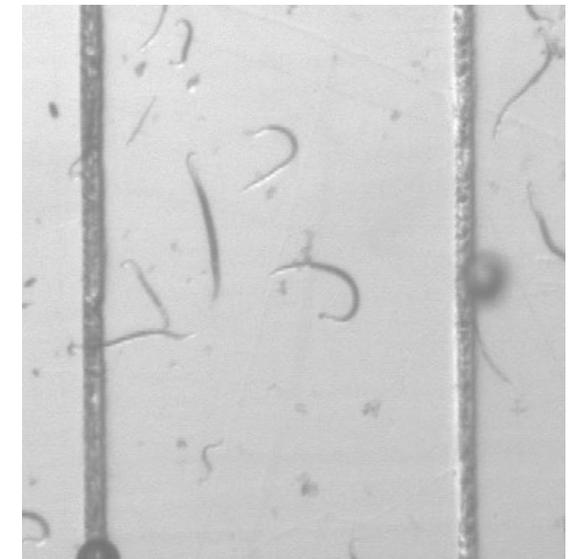


Netzflecken-  
Krankheit Gerste

Blattsegment-  
Resistenztest auf  
Cercospora  
Resistenz



Rhizoctonia-Resistenztest im  
Gewächshaus



Quantitative Bestimmung freilebender  
Nematoden nach Schlupf aus  
Gerstenwurzeln unter dem Mikroskop

# Bestimmung von Resistenz unter Feldbedingungen

Vor allem zur Bestimmung der quantitativen Resistenz

Einteilen der Genotypen in eine Infektionsskala

wird in jedem Zuchtverfahren durchgeführt

Benötigt ausreichend Saatgut → erst in späteren Generationen, Linienzüchtung bei Getreide ab F3

natürliche Infektion

- Testverfahren für luftbürtige Pilze
- anfälligen Standard als Inokulum in Hauptwindrichtung in Streifen anbauen (Infektionsstreifen)

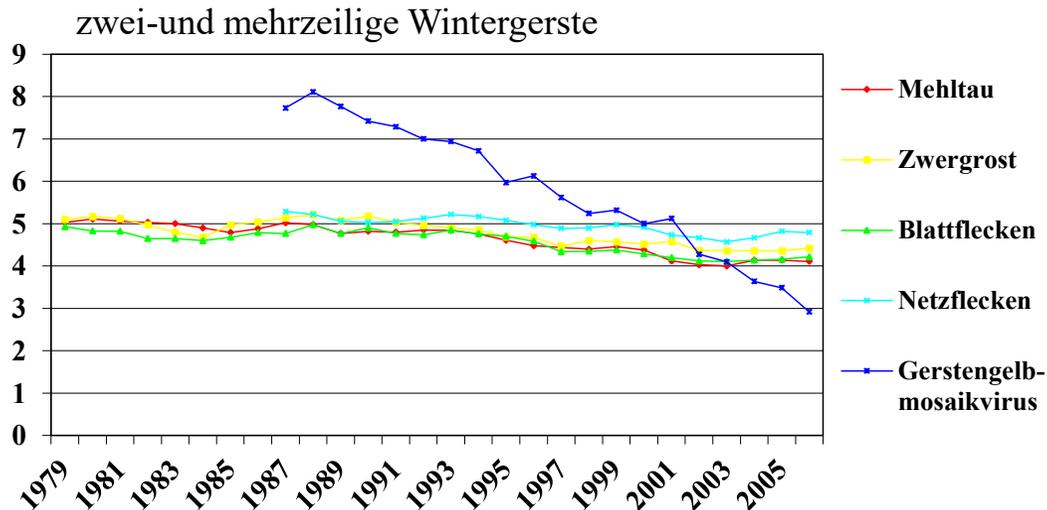
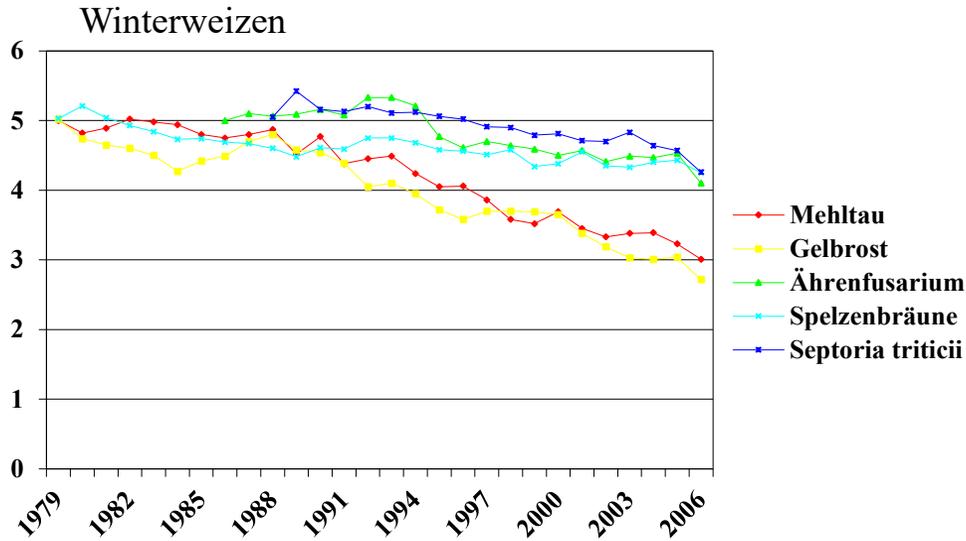
künstliche Inokulation im Feld

- Blatt- und Ähreninfektion durch Sprühinfektion mit Konidien (*Septoria tritici*, *Fusarium*, *Claviceps*)
- Maisstoppelmethode: *Fusarium*, vom BSA für amtliche Prüfungen verwendet
- Erreger von Fußkrankheiten: Mulchsaat in Vorjahresbestände



Phytophthora-Resistenztest im Feld  
Photo: BASF Plant Science

# Entwicklung der durchschnittlichen Boniturwerte für einige Pilzerkrankungen bei Winterweizen und Wintergerste



Sortenbezeichnung	Neigung zu			Anfälligkeit für				Ertragseigenschaften								
	Ährenschneben Reife	Pflanzenlänge	Auswinterung Lager	Halmknicken	Ährenknicken	Mehltau	Netzflecken	Rhynchosporium Zwergrost	Gelbmosaikvirus	Bestandesdichte Kornzahl / Ähre Tausendkorngewicht						
<b>Zweizeilige (Forts.)</b>																
Hanna	5	5	4	5	3	3	4	6	5	4	5	9	9	2	7	
Intro	6	5	5	4	4	4	3	4	4	8	2	9	6	3	8	
Jasmin	5	6	5	4	3	3	4	6	5	4	4	9	8	2	8	
Jolante	6	6	4	5	3	5	4	6	4	5	5	9	8	3	6	
Jura	6	6	4	4	3	3	2	5	4	4	4	9	8	-	7	
Labea	5	5	4	5	2	4	6	6	5	4	3	1	7	2	8	
Marinka	6	6	5	4	3	3	2	4	5	4	6	9	7	3	7	
Pastoral	5	5	4	5	4	5	6	6	5	5	5	9	9	2	6	
+ Punch	6	5	3	6	2	3	4	2	5	4	2	1	9	-	6	
Regina	6	6	4	5	3	3	2	7	4	4	4	9	7	-	6	
Sonja	5	5	5	5	5	6	6	6	5	5	-	9	7	-	7	
+ Svenja	6	6	4	3	4	4	3	3	4	4	5	1	8	-	7	
Target	5	6	4	5	4	4	5	5	5	5	5	1	8	2	7	
+ Tiffany	6	6	4	4	3	4	3	4	4	3	3	9	7	-	7	
+ Tokyo	6	6	4	6	3	5	6	3	5	6	2	1*	9	-	4	
Trasco	5	5	4	5	3	4	3	5	4	4	4	9	8	2	6	
Trixi	5	5	4	5	3	5	4	6	5	5	5	9	8	3	6	
Virac	5	5	4	4	2	3	3	5	5	5	4	1	7	-	7	
<i>Zur Ausfuhr außerhalb der Vertragsstaaten bestimmt. <sup>2)</sup></i>																
Melanie																
<b>Nacktgerste</b>																
Hiberna	4	5	5	6	4	4	4	5	5	6	6	9	7	2	5	

# Fortschritte der Resistenzzüchtung in Winterweizen gegen pilzliche Krankheitserreger

178 Winterweizensorten der letzten 50 Jahre

zwei N-Raten

Mit und ohne Fungizidbehandlung

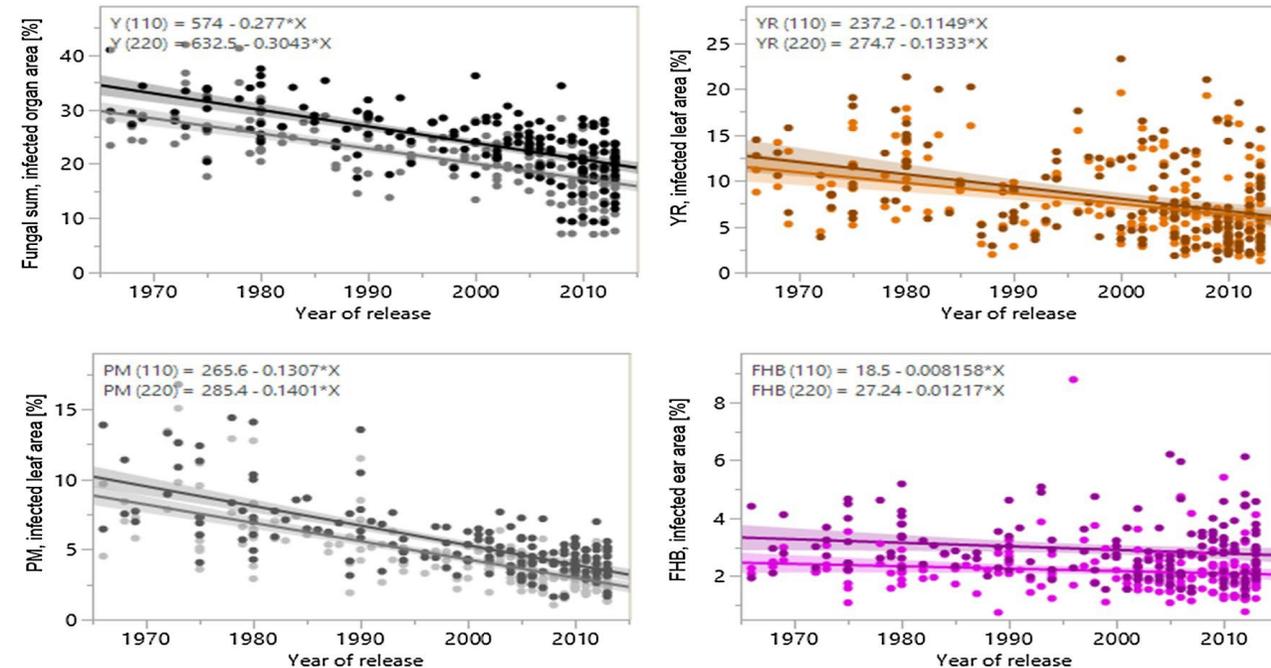
Künstliche Infektionen mit Streifenrost (YR), Echter Mehltau (PM) und Fusarium (FHB)

breite genotypische Variation zwischen den Sorten, die von nahezu resistent bis hoch anfällig für alle getesteten Krankheitserreger reicht

Stetige Zunahme der Resistenz über die letzten 50 Jahre

- Jährlicher Ertragszuwachs +0,75% / Jahr
- +0,55%/Jahr bei beiden Behandlungen mit Pflanzenschutz unabhängig vom N-Input
- +0,86%/Jahr bei der Behandlung mit geringer Intensität
- +1,33%/Jahr ohne Pflanzenschutz bei hoher N-Düngung

Die N-Düngung erhöhte signifikant die Anfälligkeit für biotrophe und hemibiotrophe Erreger.



Entwicklung der Anfälligkeit für vier pilzliche Krankheitserreger

# Züchtung dauerhaft resistenter Sorten

.... ist ein primäres Ziel der Resistenzzüchtung

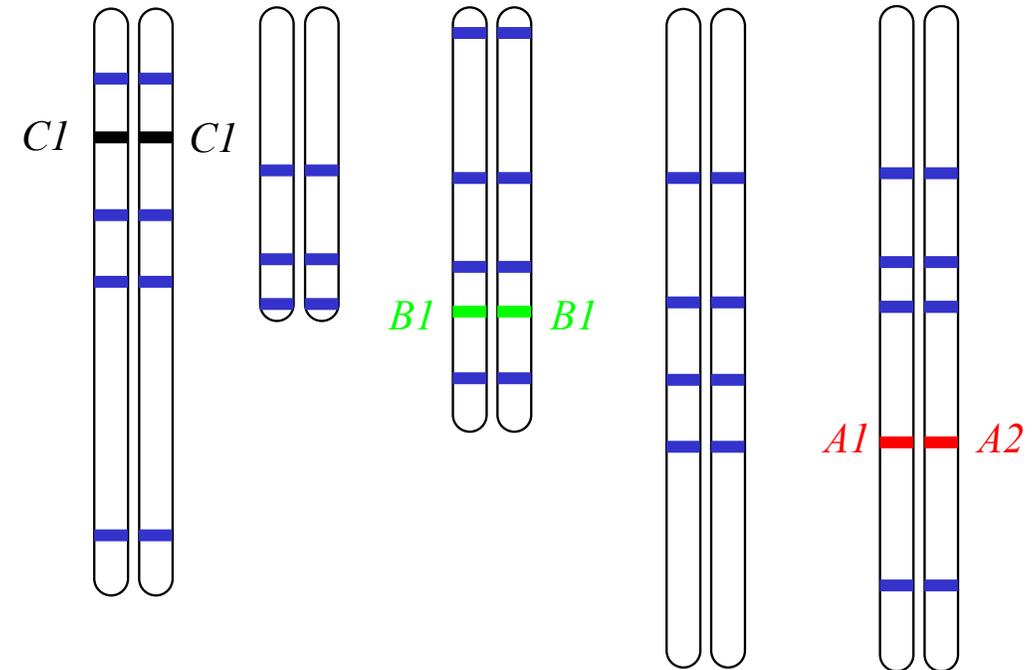
Mehrere oder möglichst alle bekannten Resistenzgene werden in einer Sorte eingelagert.

- Problem: Resistenz gegen verschiedene Rassen wird oft durch multiple Allele desselben Gens bedingt. Das heißt, in einem diploiden Organismus können maximal zwei Allele (zwei Resistenzen) vereint werden.
- Lösung: Gentechnik

Züchtung von Sorten mit quantitativer Resistenz

Züchtung von Vielliniensorten (multi lineal varieties)

- Mischung von sonst einheitlichen aber verschiedene Resistenzgene enthaltenden Linien.
- Die Linienmischung kann aufgrund der laufenden Bestimmung des Rassenspektrums der Pilzpopulation von Zeit zu Zeit geändert werden.



# Gentechnisch erzeugt Resistenz

# Resistenz gegen Insekten durch Einsatz von *bt*-Genen aus *Bacillus thuringiensis*

## Wirkung auf Ziel- und Nicht-Zielarten

- hochspezifisch toxisch für Larven von Lepidopteren, Dipteren und Coleopteren
- keine Wirkungen auf Marienkäfer, Honigbienen, parasit. Hymenopterenlarven, Florfliegen

## Funktionsweise des bt-Proteins

- Protoxin wird im alkalischen Milieu des Insektendarms aufgelöst und durch Proteasen in ein kleineres aktives toxisches Protein ( $\delta$ -Endotoxin) gespalten.
- Dieses bindet an spezifische Rezeptoren im Insektendarm.
- Dadurch werden die Zellen lysiert und die Insektenlarve stirbt ab.

Sequenzhomologien zwischen Cry-Proteinen: 20-90%

Durch Einwirken von bt lysierte  
Insektenlarven



# Erzeugung von *bt*-resistenten Pflanzen

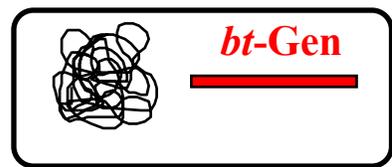
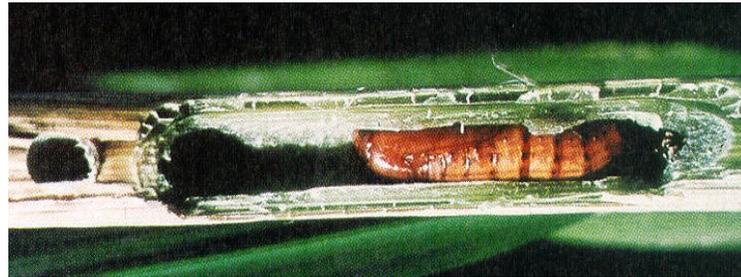
1981: *bt*-Gen kloniert

1986: Gen funktionell in Pflanzen

Seit 1996 großflächiger Anbau, Mais, Baumwolle, u.a.

Auf über 100 Mill ha/a

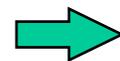
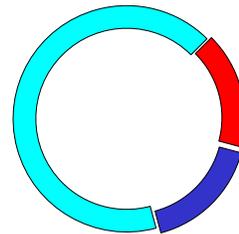
Maislinie MON810 mit Resistenz gegen den Maiszünsler



*Bacillus thuringiensis*



Transformations-  
vektor



Transformation



Pflanzenpromotor



Results of insect infestation on Bt (right) and non-Bt (left) cotton bolls. Source: USDA



Baumwollkapselkäfer

Photos: Bayer, Monsanto

# Gemüseanbau in Bangladesch

Bangladesch:

- Bevölkerung: 165 Millionen (2017)
- Fläche: 147,570 km<sup>2</sup>

Brinjal (eggplant, Aubergine)

- 64,208 ha
- Etwa 25% des gesamten Gemüseanbaus

Der *Fruit and Shoot Borer* (FSB) ist einer der wichtigsten Schädlinge

- Im traditionellen Anbau wird bis zu 84x in einer Saison mit Insektiziden gespritzt
- Oft jeden 2. Tag oder 2x/Tag (morgens & nachmittags)



# Anbau von Fruit and Shoot Borer resistenten Auberginen mit dem *bt*-Gen aus *B. thuringiensis*

Beginn des Anbaus 2015

Bis zu 30% mehr Ertrag

Anzahl der Insektizid-Behandlungen um 71-90% reduziert



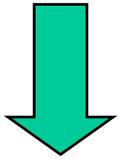
bt Sorte Uttara



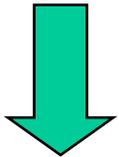
Nicht-bt Sorte Uttara

# Resistenz gegen Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel (*Phytophthora infestans*)

*Solanum bulbocastanum*



Resistenzgen identifiziert



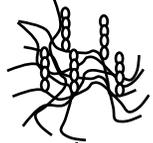
Transformation in Kartoffeln



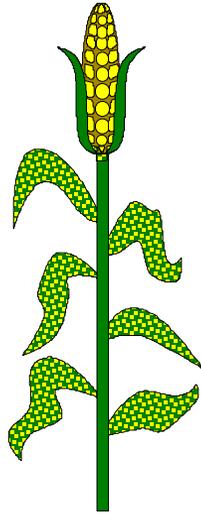
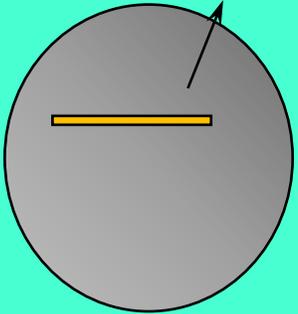
Gentechnisch veränderte, resistente Kartoffel *Fortuna* (BASF Plant Science)

# Resistenz gegen Schaderreger durch *genome editing* von Anfälligkeitsgenen

Pathogen



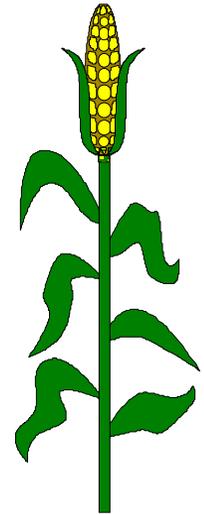
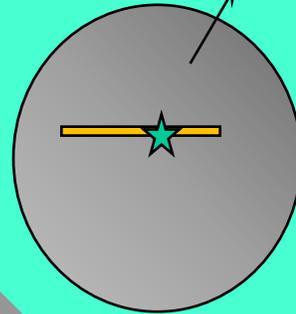
Ziel-Protein



Befall mit  
Schaderreger



Verändertes  
Ziel-Protein



Kein Befall,  
Resistenz

 Ziel-Gen  
 Mutiertes Ziel-Gen

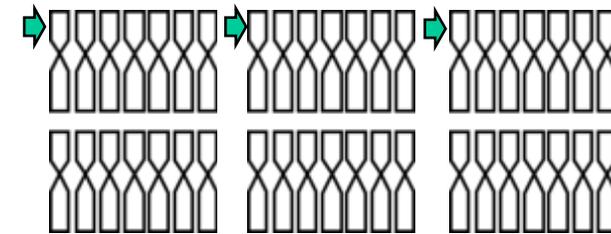
# Gezielte Inaktivierung von drei Genen für Mehltau-Anfälligkeit in Weizen durch genome editing

drei Gene (Homoeoallele) des *MILDEW-RESISTANCE LOCUS* (*TaMLO*)

Genredundanz hat bisher die Selektion von resistenten Pflanzen in natürlichen Populationen verhindert

TALEN-and CRISPR-Cas9 induzierte Mutationen aller drei *TaMLO* Gene in ein und derselben Pflanze

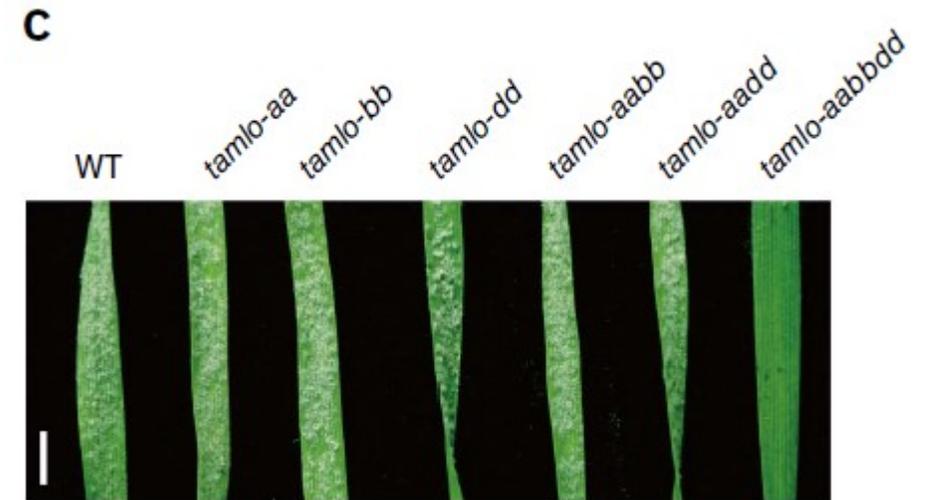
→ vererbare Mehltau-Resistenz mit einem breiten Rassenspektrum



```

T0-1 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcacg.....TATGCATCTCCCA -19
T0-2 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcacgcagga...aatctcCGGGATATGCATCTCCCA -3
T0-3 A1: .....caatctcCGGGATATGCATCTCCCA -32
      B1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcagga/ccccatctcCGGGATATGCATCTCCGA +141
      D1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcagga...../GGATATGCATCTCCGA -11/+81
T0-4 D1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcag...atctcCGGGATATGCATCTCCGA -5
T0-5 D1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcag....aatctcCGGGATATGCATCTCCGA -5
T0-6 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcacgca....aatctcCGGGATATGCATCTCCCA -6
      TCGCTGCTGCTCGCCGTcacgcagga...aatctcCGGGATATGCATCTCCCA -3
      TCGCTGCTGCTCGCCGTcacgcagga...atctcCGGGATATGCATCTCCCA -4
      TCGCTGCTGCTCGCCGTcacgcaggac..aatctcCGGGATATGCATCTCCCA -2
T0-7 D1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcaggac..aatctcCGGGATATGCATCTCCGA -2
T0-8 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcacgcag.....tctcCGGGATATGCATCTCCCA -7
      TCGCTGCTGCTCGCCGTcacgcag...caatctcCGGGATATGCATCTCCCA -3
      B1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcagg../ccccatctcCGGGATATGCATCTCCGA -2/+113
T0-9 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcacg.....tctcCGGGATATGCATCTCCCA -10
      D1: TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcaggac....ctcCGGGATATGCATCTCCGA -5
      TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcaggac...tctcCGGGATATGCATCTCCGA -4
      TCGCTGCTGCTCGCCGTgacgcaggac..aatctcCGGGATATGCATCTCCGA -2
T0-10 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcacg.....ctcCGGGATATGCATCTCCCA -11
T0-11 A1: TCGCTGCTGCTCGCCGTcacg.../gacccaatctcCGGGATATGCATCTCCCA -3/+61
      D1: TCGCTGCTGCTC.....CATCTCCGA -29
T0-12 A1: TCGCTGCCGCTCGCCGTcacgc.....atctcCGGGATATGCATCTCCCA -8
T0-13 A1: TCGCTGCCGCTCGCCGTcacgcagga.....ctcCGGGATATGCATCTCCCA -6
T0-14 A1: TCGCTGCCGCTCGCCGTcacgc.....aatctcCGGGATATGCATCTCCCA -7
T0-15 A1: TCGCTGCCGCTCGCCGTcacgca.....cCGGGATATGCATCTCCCA -11
  
```

TALEN-induzierte mutierte *TaMLO* Allele



Blatt-Phänotypen nach Infektion von WT und *mlo* Mutanten 7 Tage nach Inokulation der isolierten Blätter mit *Blumeria graminis*.

# Resistenz gegen tierische Schaderreger

# Steigende Probleme durch tierische Schadorganismen

Wichtige Wirkstoffe sind nicht mehr/werden nicht mehr verfügbar sein

Klimawandel: milde Winter verschärfen das Problem, weil sich der Metabolismus und die Reproduktionsrate der Insekten-Populationen mit steigender Temperatur erhöht.

Ein durchschnittlicher Anstieg der Oberflächen-Temperaturen um 2°C erhöht die Verluste durch Insekten-Schädlinge bei

- Weizen um 6%
- Reis um 19%,
- Mais um 31%

Die stärksten Ertragsverluste werden in den ertragreichsten Regionen der Erde erwartet

Weizen-Produktion Deutschland:

- Temperaturanstieg um 2°C
- Prognostizierte zusätzliche jährliche Ernteverluste durch Insekten: 0.36 – 1.03 Mill t/a (=2.1 – 6.2%)

# Tierische Schaderreger (nur Wirbellose)

## Insekten

- saugende
- beißende

## Milben

## Collembolen

## Nematoden



# Abwehrmechanismen gegen Insekten

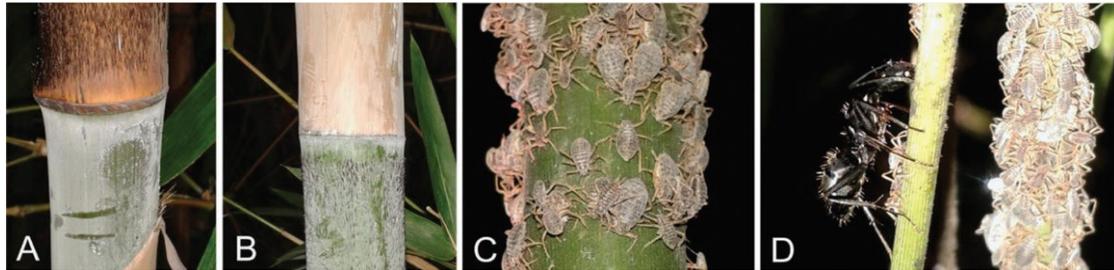
## Konstitutive

- Cuticulare Wachse mit anti-adhäsiver Wirkung auf das Anheften des Insekts auf der Oberfläche
- Morphologische Eigenschaften: Dornen, Stacheln, Trichome, Lignifizierung als mechanische Barrieren
- glandulare Trichome und die darin vorhandenen Substanzen
- Konstitutiv gebildete Gift- und Abwehrstoffe (z.B. Solanin)

## Induzierbare

- Biosynthese spezifischer sekundärer Metabolite mit anti-nutritiven Wirkungen

Stem guard syndrome. Surface of young culms in *Bambusa chungii* (A) and *B. emeiensis* (B) showing whitish epicuticular wax coverage, and aphid infestation on young culms



# Identifikation des *Hs4* Gens für Zystennematoden-Resistenz in Beta-Rüben



Avneesh Kumar



Stammt aus einer verwandtschaftlich weit entfernten Wildart

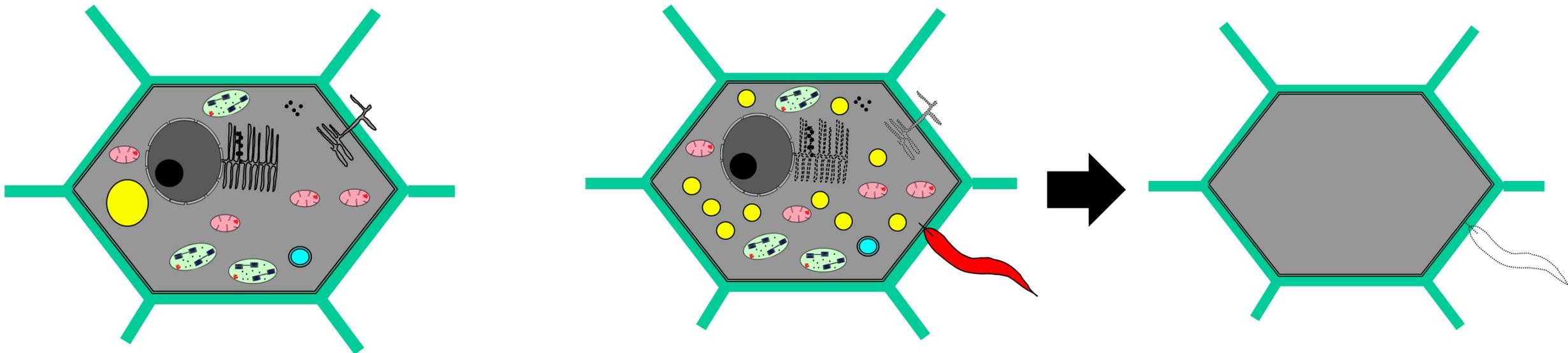
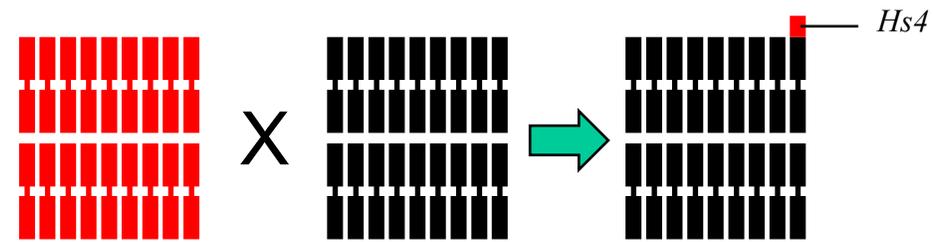
Kreuzungen sind äußerst schwierig

Gen liegt auf einer Chromosomen-Translokation

Resistente Sorten haben deutlich weniger Ertrag

*Hs4* Gen:

- Kodiert für eine Protease
- Selbstmordgen, führt zum Zusammenbruch der Nährzelle



# Fazit

## Erfolge

- Molekulare Wirt-Pathogen-Interaktion
- Virusresistenz
- Pilzresistenz
- Gentechnik

## Herausforderungen

- Insekten und andere tierische Schaderreger
- Dauerhafte Resistenz