

Resistenzzüchtung bei Nutzpflanzen

Christian Jung

c.jung@plantbreeding.uni-kiel.de
<http://www.plantbreeding.uni-kiel.de>



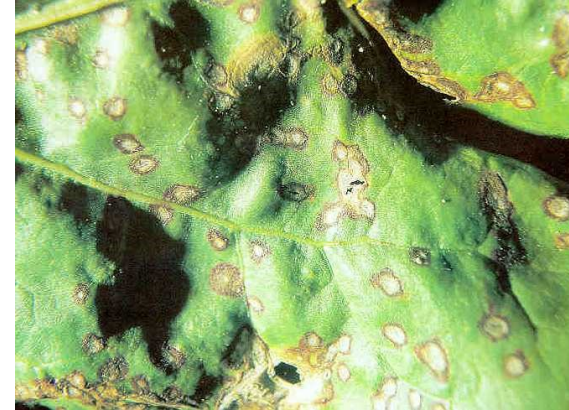
**Plant Breeding
Institute**



Schaderreger und epidemiologische Grundlagen

Pflanzliche Krankheitserreger und Schädlinge

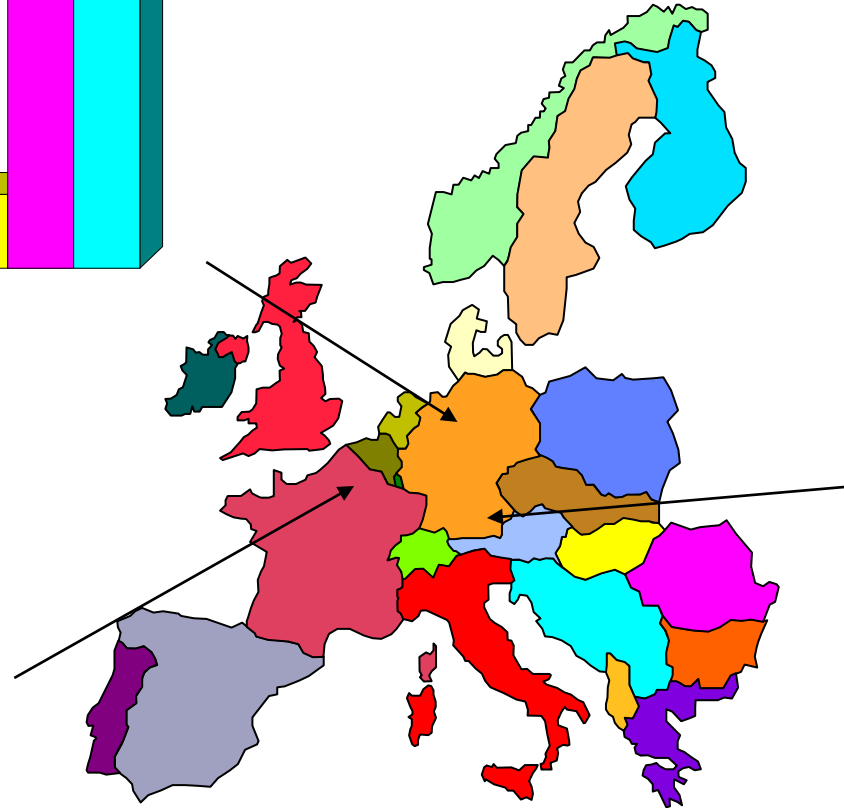
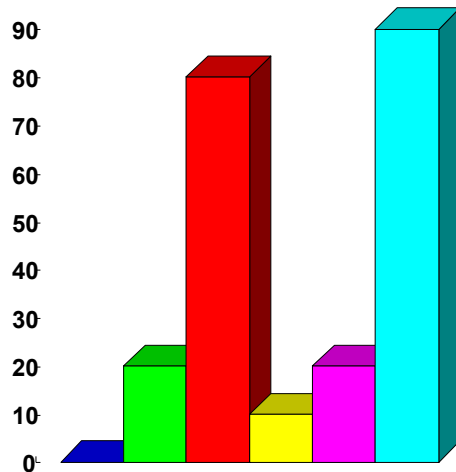
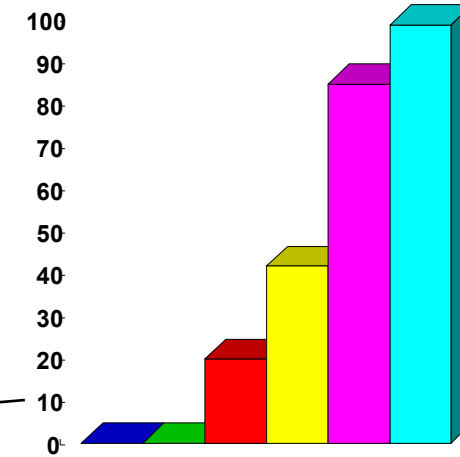
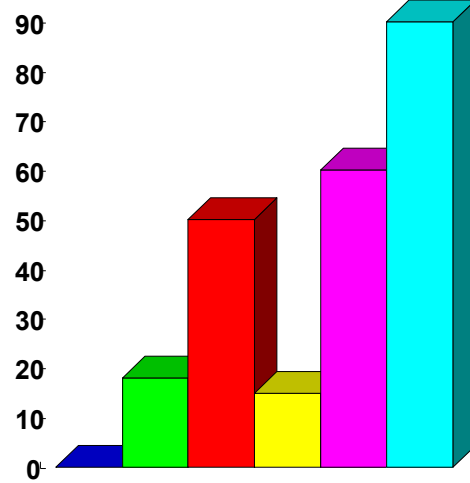
- luftbürtige Pilze
- bodenbürtige Pilze
- Oomyceten
- Protisten
- Phytoplasmen
- Bakterien
- Viren, Viroide
- Nematoden
- Insekten



<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

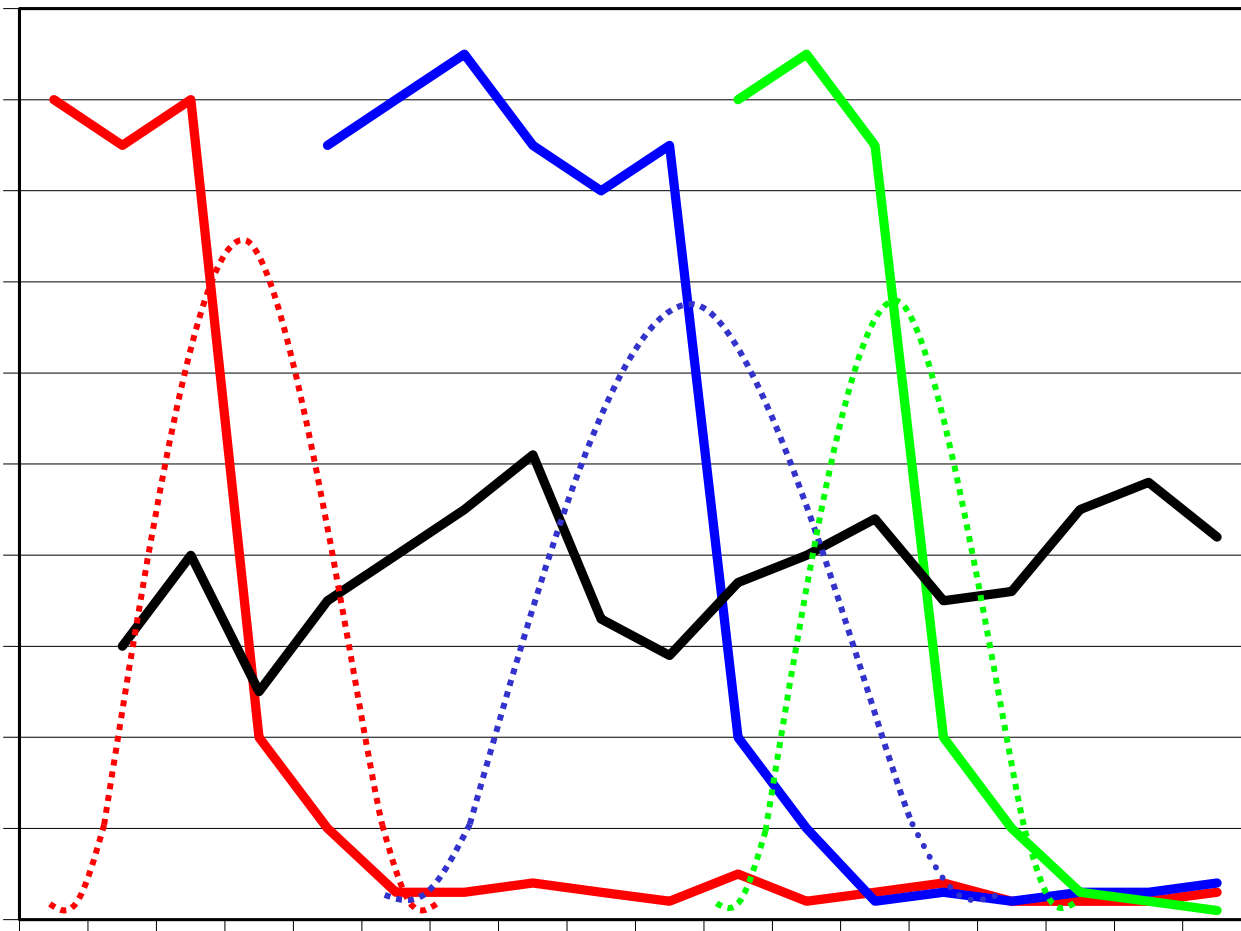
40

30

20

10

0



Häufigkeit der Avirulenzgene:

avr 1
avr 2
avr 3

R1
R2
R3
horizontale R.

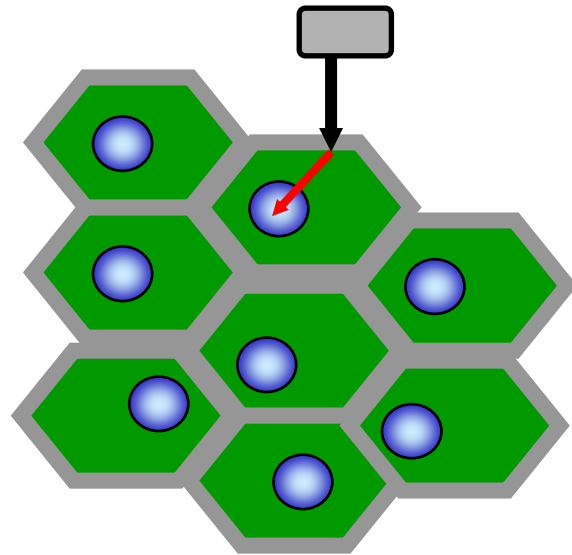
quantitativ: horizontal

qualitativ: vertikal

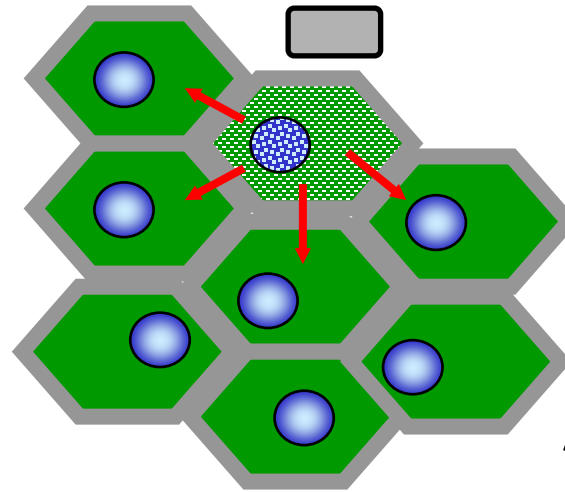
Zeit

Molekulare und genetische Grundlagen der Resistenzzüchtung

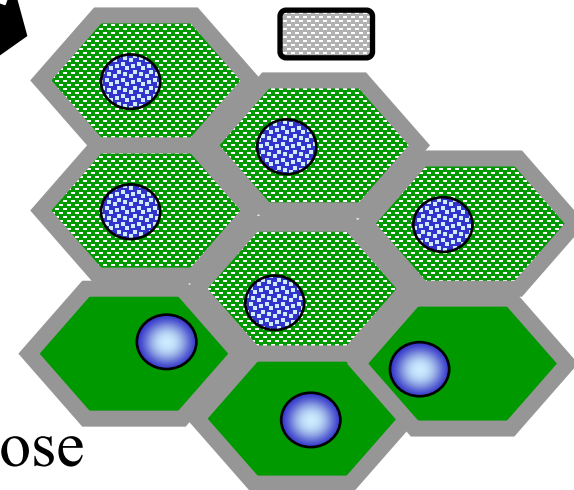
Pathogen-induzierter Zelltod



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

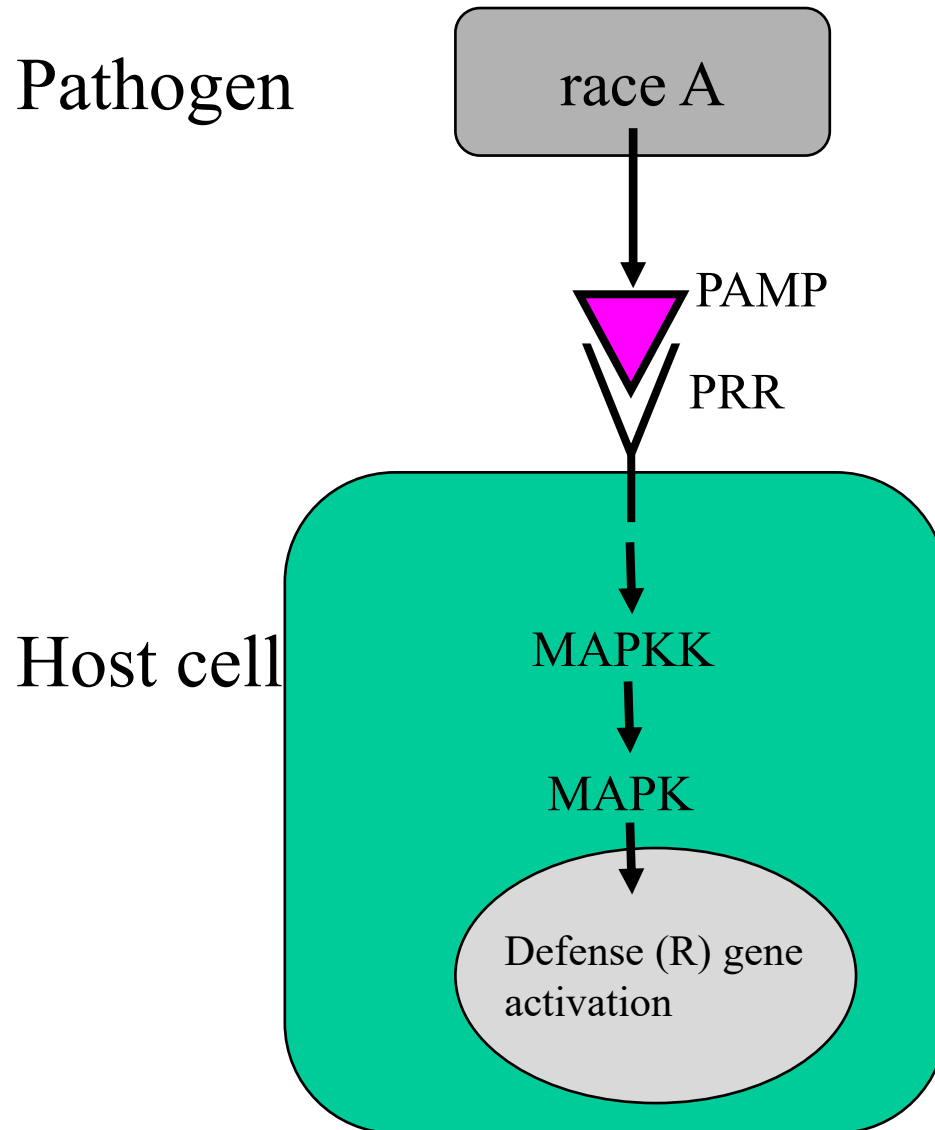


lokaler Zelltod
Signalweitergabe



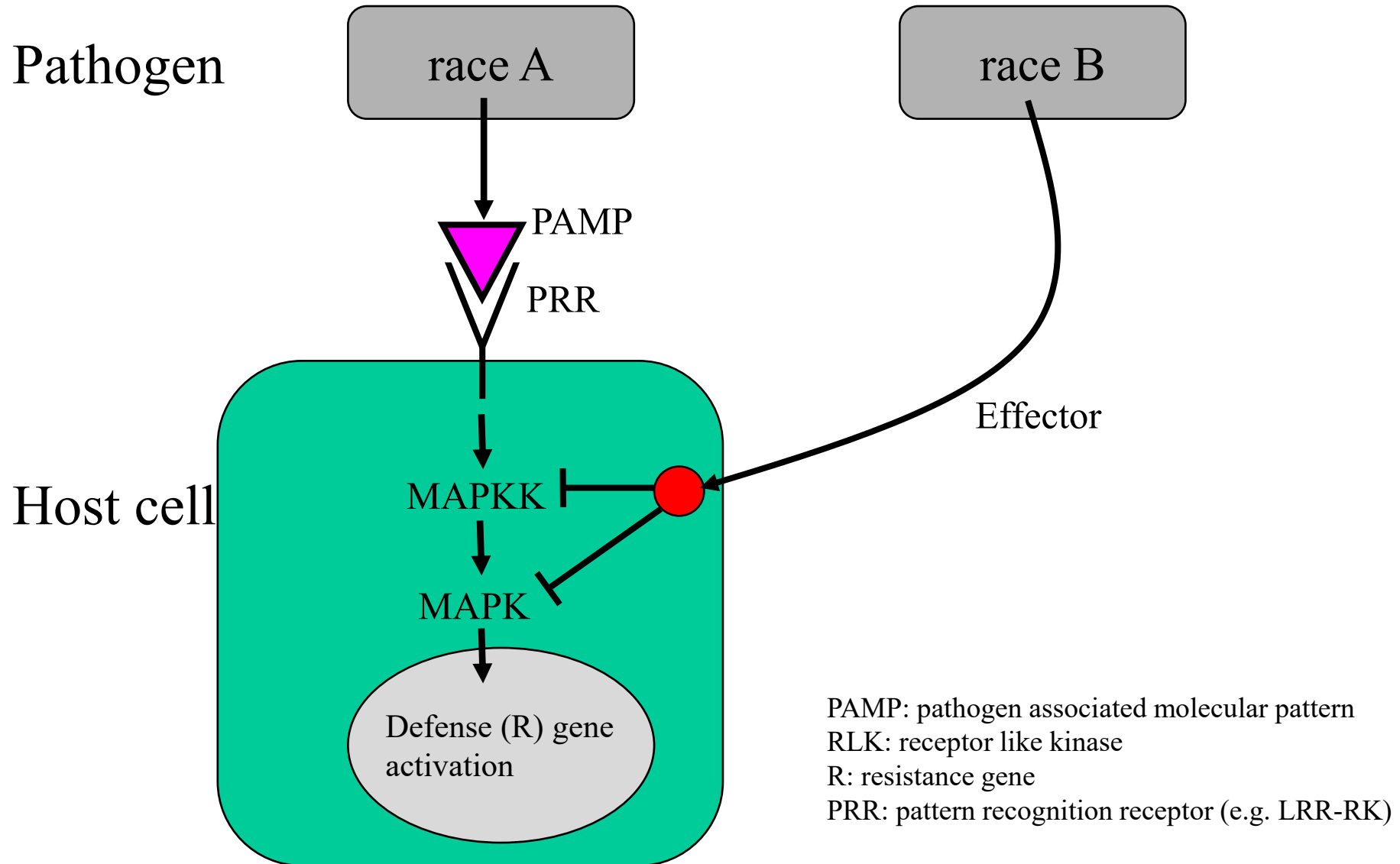
Nekrose

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

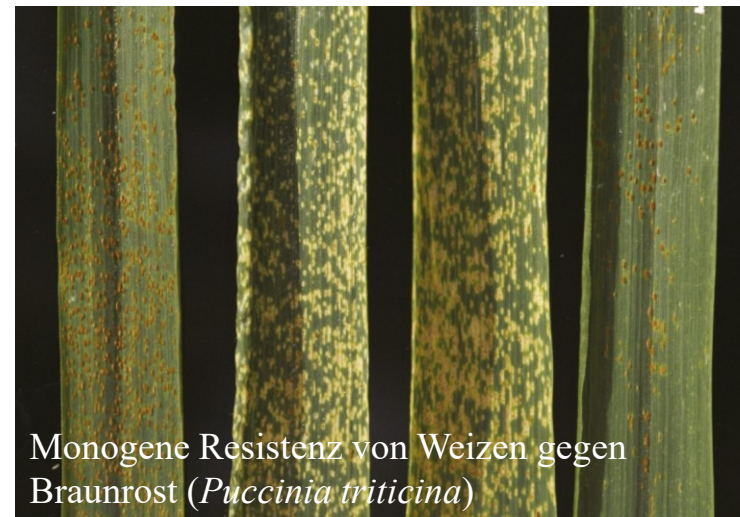
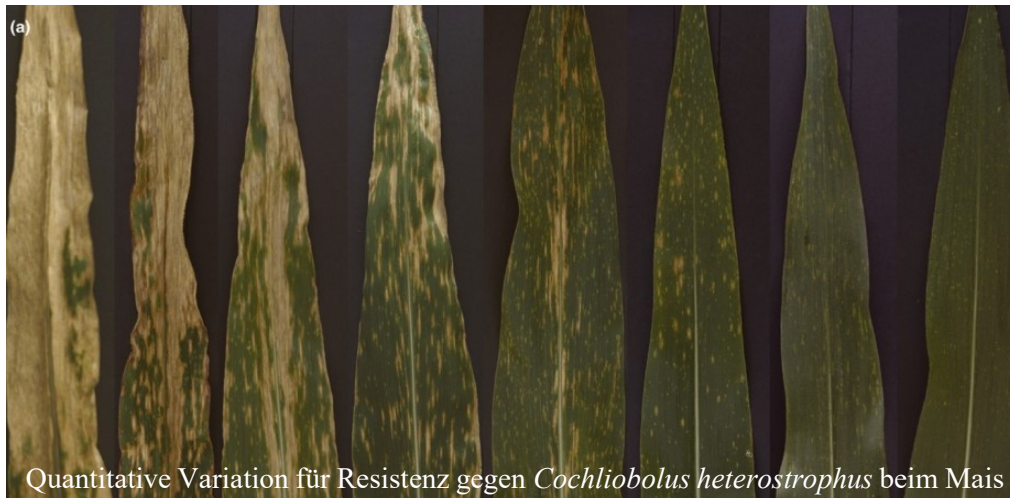
Monogene Resistenz vs. polygene Krankheits- und Schädlingsresistenz

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

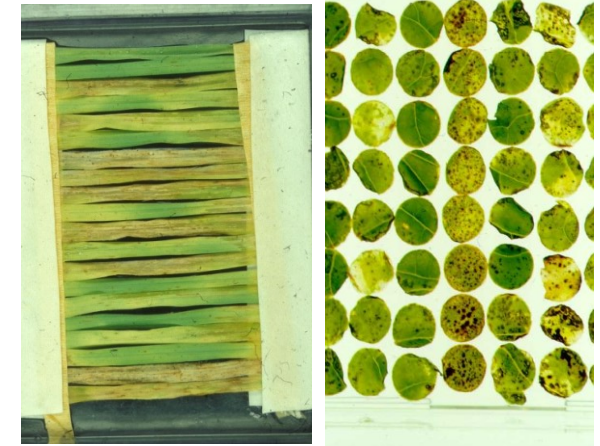
Blattsegmenttests

- 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)

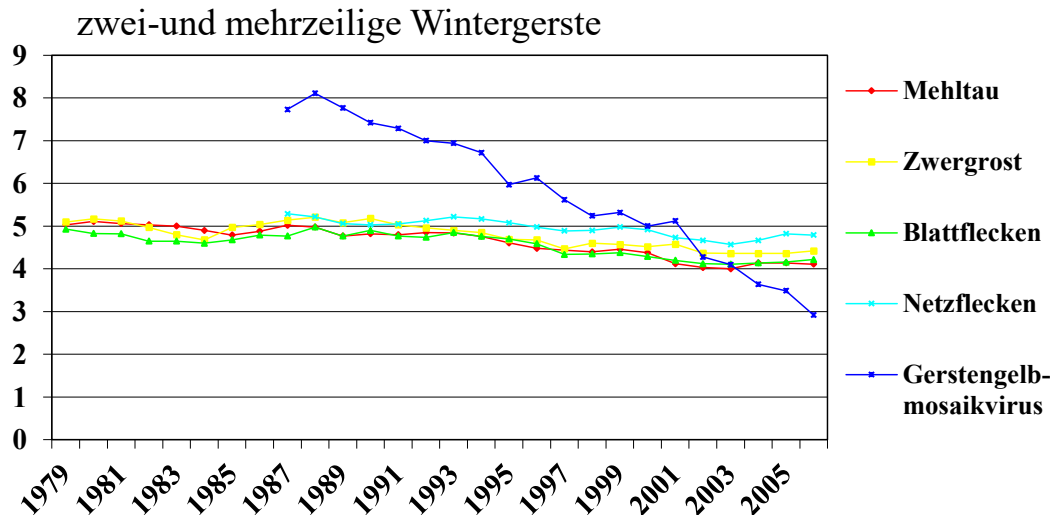
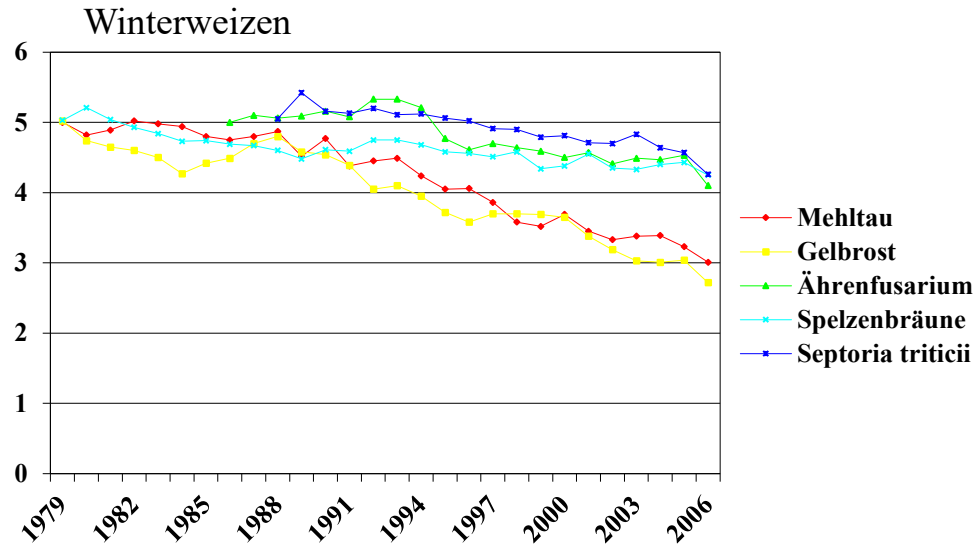
künstliche Inokulation im Feld

- 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				
Zweizeilige (Forts.)															
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. ²⁾</i>															
Melanie															
Nacktgerste															
Hiberna	4	5	5	6	4	4	4	5	5	6	6	9	7	2	5

Jung C (2013) Pflanzliche Resistenz gegen Schaderreger und Pflanzenschutz. *Lehrbuch der Phytomedizin*, eds Poehling H-M & Verreet J-A (Eugen Ulmer, Stuttgart), 4 Ed, pp 415-432.

Fortschritte der Resistenzzüchtung in Winterweizen gegen pilzliche Krankheitserreger

178 Winterweizensorten der letzten 50 Jahre

zwei N-Raten

Mit und ohne Fungizidbehandlung

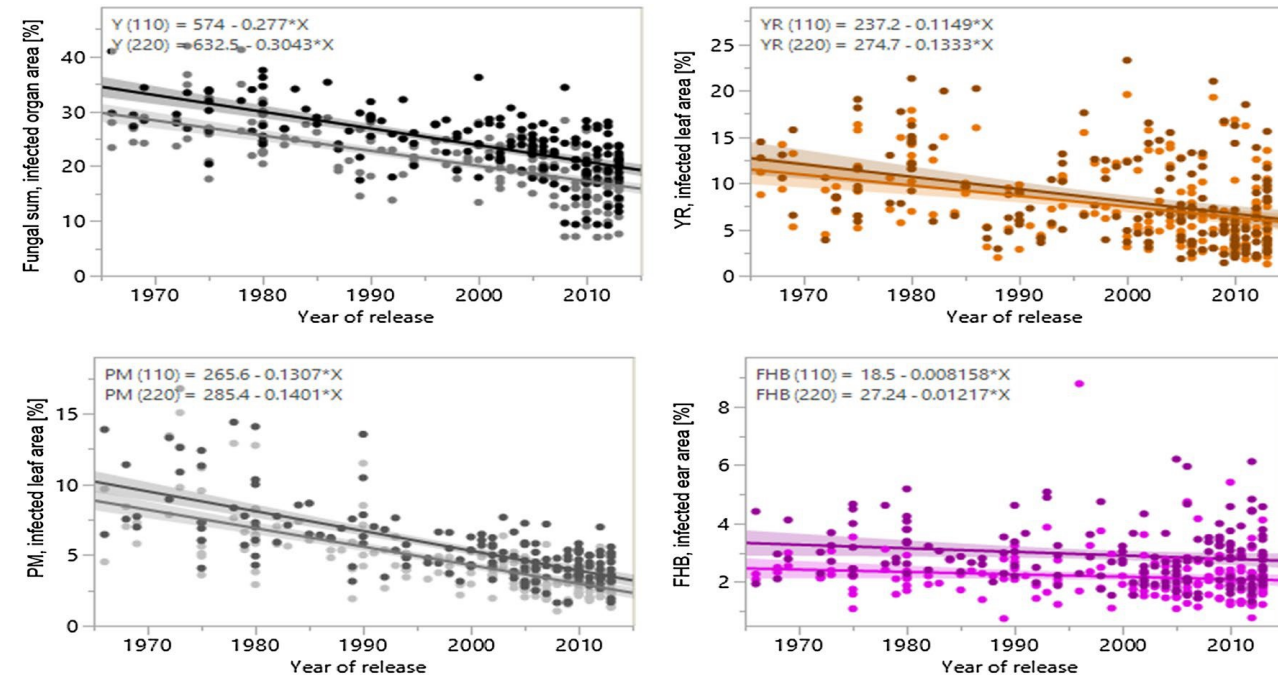
Künstliche Infektionen mit Streifenrost (YR), Echter Mehltau (PM) und Fusarium (FHB)

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

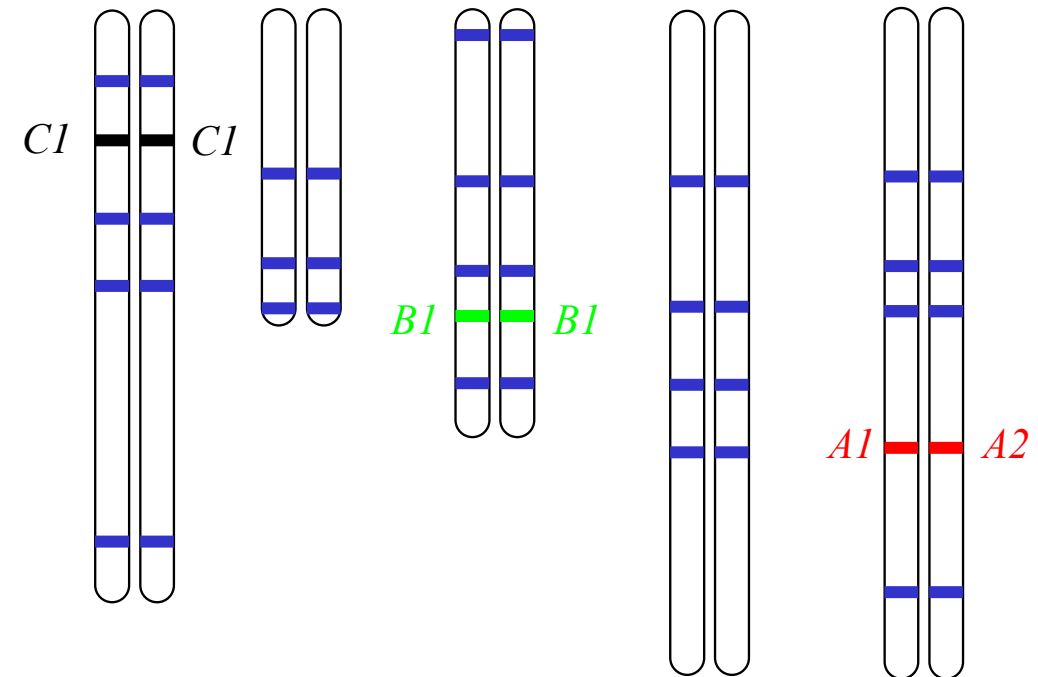
Mehrere oder möglichst alle bekannten Resistenzgene werden in einer Sorte eingelagert.

- 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 (δ -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

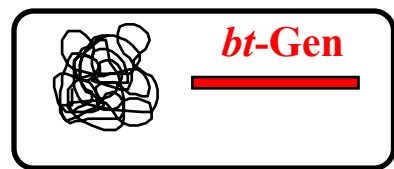
1981: *bt*-Gen kloniert

1986: Gen funktionell in Pflanzen

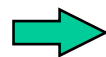
Seit 1996 großflächiger Anbau, Mais, Baumwolle, u.a.

Auf über 100 Mill ha/a

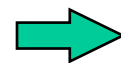
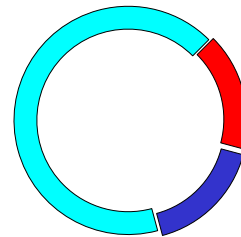
Maislinie MON810 mit Resistenz gegen den Maiszünsler



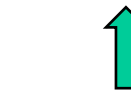
Bacillus thuringiensis



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 km²

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



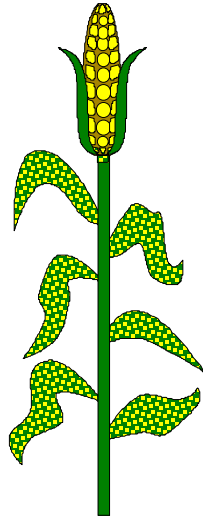
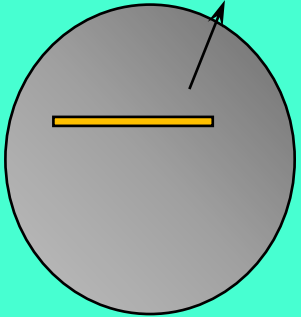
Gentechnisch veränderte, resistente Kartoffel *Fortuna* (BASF Plant Science)

Resistenz gegen Schaderreger durch *genome editing* von Anfälligkeitsgenen

Pathogen



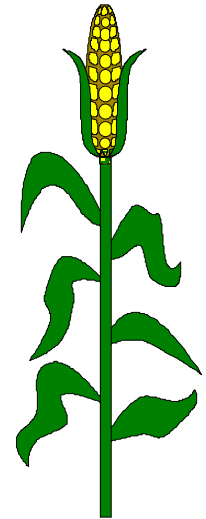
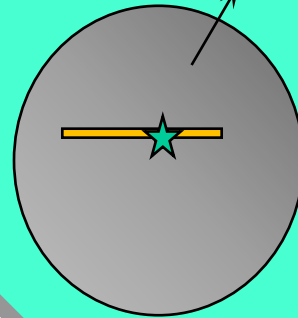
Ziel-Protein



Befall mit
Schaderreger



Verändertes
Ziel-Protein



Kein Befall,
Resistenz

 Ziel-Gen
 Mutiertes Ziel-Gen

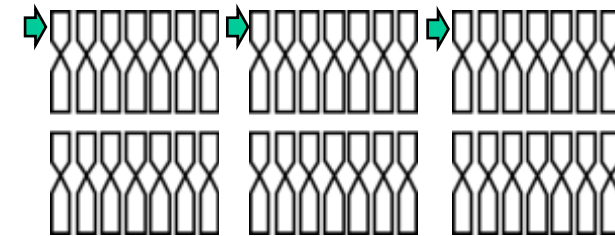
Gezielte Inaktivierung von drei Genen für Mehltau-Anfälligkeit in Weizen durch genome editing

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

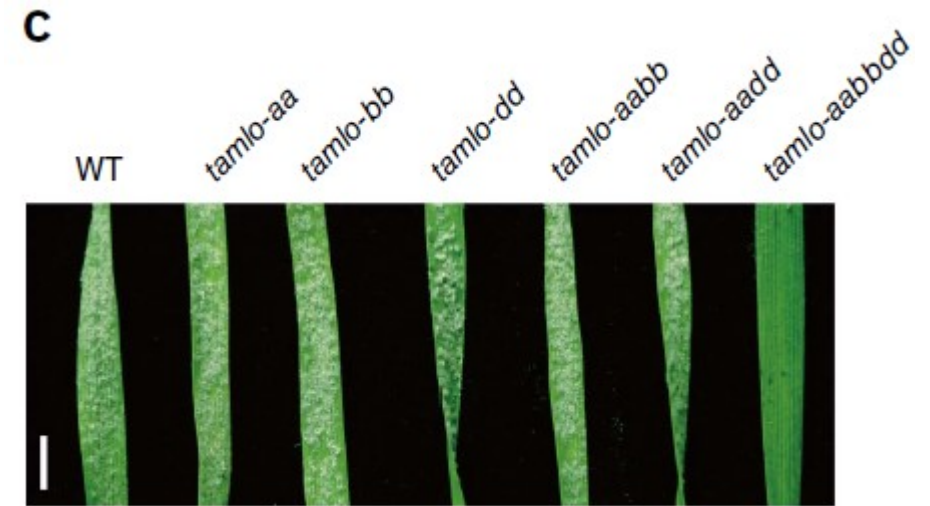
→ vererbare Mehltau-Resistenz mit einem breiten Rassenspektrum



```

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

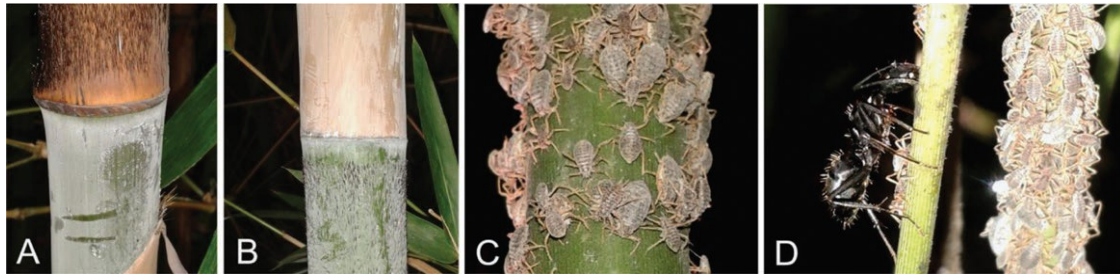
Konstitutive

- 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

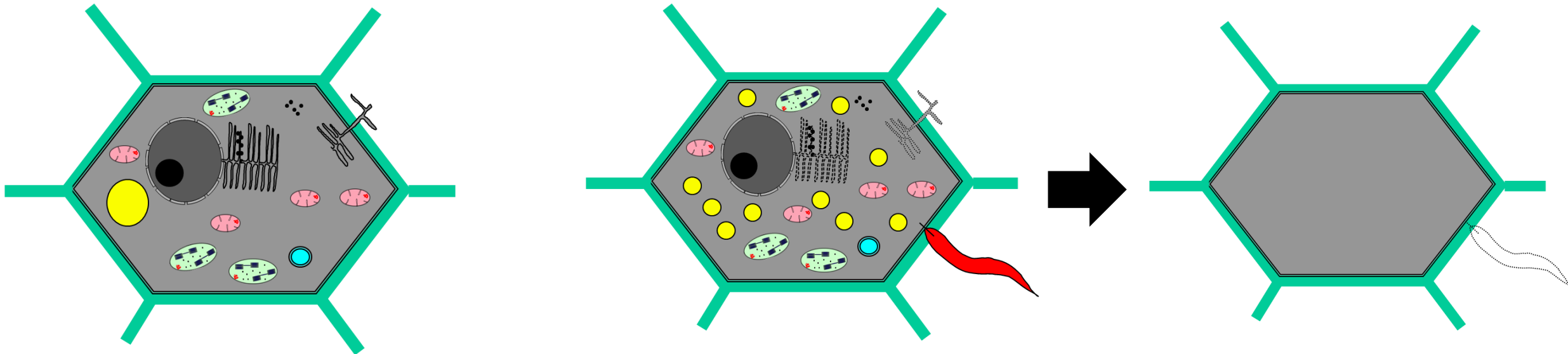
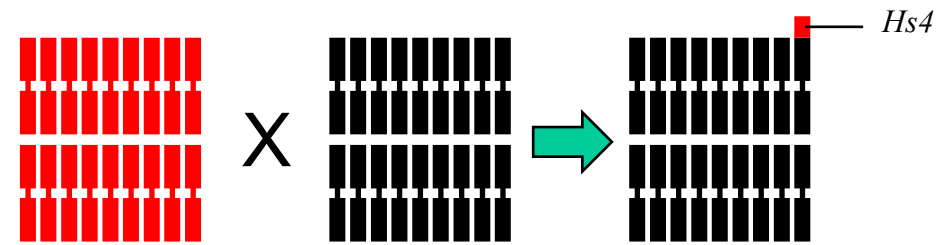
Kreuzungen sind äußerst schwierig

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