

Literatur

- Backhaus, G.F. & Neubauer, C., 1996: *Cylindrocladium scoparium* – Gefährlicher Krankheitserreger an Moorbeetpflanzen. Rhododendron und immergrüne Laubgehölze – Jahrbuch **1996**: 78-93
- Bundessortenamt, 2000: Beschreibende Sortenliste Topfazalee. 2. ed. Landbuch-Verlag, Hannover: 59, 95
- De Keyser, E., De Riek, J. & Heungens, K., 2008: Development of supporting techniques for pot azalea (*Rhododendron simsii* hybrids) breeding focused on plant quality, disease resistance and enlargement of the assortment. Acta Hort. **766**: 361-366
- Hunter, B.B. & Barnett, H.L., 1970: Growth and sporulation of species and isolates of *Cylindrocladium*. Mycologia **70**: 614-635
- Kamoen, O. & Heursel, J., 1983: *Cylindrocladium scoparium*. Gb + Gw **30**: 783-784
- Morgan, A. P., 1892: Two new genera of hyphomycetes. The Botanical Gazette **17**: 190-192
- Krämer, R., 2010: mündliche Mitteilung, Julius Kühn-Institut, Quedlinburg
- Nothnagel, T. & Krämer, R., 2007: Establishment of a digital image analysis system for resistance tests against various carrot pathogens. 32nd International Carrot Conference, Bordeaux, September 5-7, 2007: 98
- Plaschil, S. & Krämer, R., 2010: A digital image analysis system (DIAS) for assessment of bioassays on *Rhododendron simsii* against *Cylindrocladium scoparium*. Acta Hort. **855**: 221-224
- Stegmann, W., 1988: Untersuchungen zur Pathogenese, Epidemiologie und Bekämpfung der Stammgrundfäule an *Rhododendron simsii* (*Cylindrocladium scoparium*). Dissertation Universität Hannover
- Systat Software, Inc., 2009: *SYSTAT 13*. Chicago, CA: Systat Software, Inc.

Forschungsergebnisse zur Sternrußtauresistenz bei Rosen

Scientific results on the resistance of roses to the black spot disease

Lühmann, Ann-Katrin; Terefe, Diro; Kohlenberg, Max; Linde, Marcus; Debener, Thomas
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzengenetik, Molekulare Pflanzenzüchtung,
Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover
Tel.: 0511 762 3345; E-Mail: linde@genetik.uni-hannover.de

DOI: 10.5073/jka.2011.433.010

Zusammenfassung

Sternrußtau, verursacht durch den hemibiotrophen Ascomyceten *D. rosae*, ist weltweit eine der wichtigsten Krankheiten an Rosen im Freiland. Mindestens 13 verschiedene Rassen des Pathogens wurden bisher beschrieben. Resistenzen gegen *D. rosae* sind vor allem in Rosenarten zu finden. Die genetische Diversität von *D. rosae* Populationen aus Deutschland hängt entscheidend vom Alter der Wirtspopulation, deren genetischer Diversität und Behandlung mit Pflanzenschutzmitteln ab. Durch die Verbreitung und Durchmischung, vor allem durch den Menschen gibt es in weltweiten Proben nur sehr geringe Unterschiede in den *D. rosae* Genotypen. In 141 Proben aus 12 Ländern konnten keine zu den deutschen SSR Allelen abweichende Allele gefunden werden. Bisher wurden drei Resistenzgene gegen *D. rosae* (*Rdr1* bis *Rdr3*) beschreiben, wobei *Rdr1* bei weitem am besten charakterisiert wurde. Das Resistenzgen *Rdr1* gegen die Rasse DortE4 konnte durch Feinkartierung auf drei BAC-Klonen lokalisiert werden. Durch die komplette Sequenzierung dieser BACs wurden neun RGAs des TIR-NBS-LRR-Typs als mögliche Kandidaten innerhalb einer 220kb Region entdeckt. Diese weisen eine Sequenzähnlichkeit von ca. 90% zueinander auf. Durch RNAi-Silencing-Experimente und Expressionsanalysen an zwei resistenten Genotypen konnte die Anzahl der Kandidatengene auf fünf reduziert werden. Mit einer transienten Komplementation des anfälligen Genotyps Paris Charme mit Vollängenklonen dieser fünf Kandidaten konnte *muRdr1-H* als das aktive *Rdr1*-Resistenzgen identifiziert werden.

Stichwörter: Ascomycet, Rassen, genetische Diversität, *Rdr1*, TIR-NBS-LRR

Abstract

Blackspot, caused by the hemibiotrophic ascomycete *D. rosae*, is one of the world's most important diseases of roses in the field. At least 13 different races of the pathogen have been described. Resistances to *D. rosae* are mainly found in rose species. The genetic diversity of *D. rosae* populations from Germany depends critically on the age of the host population, their genetic diversity and treatments with pesticides. Only very small differences in the *D. rosae* genotypes from different countries were detected, mainly caused by the distribution by man. In 141 samples from 12 countries no differing SSR alleles to the ones detected in Germany could be found. So far, three resistance genes to *D. rosae* (*Rdr1* to *Rdr3*) have been described, with *Rdr1* as the best characterized. *Rdr1* acting against the race DortE4 was localized by fine mapping to three BAC clones. Through complete sequencing of these BACs nine RGAs of the TIR-NBS-LRR-type were discovered as potential candidates within a 220kb region. These show sequence similarity of about 90% to each other. Silencing by RNAi experiments and expression analysis of two resistant genotypes reduced the number of candidate genes to five. With transient complementation of the susceptible genotype Pariser Charme with full-length clones of these five candidates *muRdr1-H* could be identified as the active RDR1 resistance gene.

Keywords: ascomycete, races, genetic diversity, *Rdr1*, TIR-NBS-LRR

Einleitung

Diplocarpon rosae Wolf, der Sternrußtau an Rosen oder im Englischen 'black spot' genannt, ist neben dem Echten Mehltau (*Podoshiera pannosa*) sowie dem Falschen Mehltau (*Peronospora sparsa*) eines der bedeutendsten Pathogene an Rosen. Weitere bedeutende pilzliche Pathogene, welche vor allem an Gartenrosen zu finden sind, sind der Rosenrost (*Phragmidium* spp.) und die Blattfleckenkrankheit *Elsinoe rosarum* (anamorphe Form: *Sphaceloma rosarum*). In Gartenrosenbeständen gehört der Sternrußtau zu den am stärksten verbreiteten pilzlichen Krankheiten. Der Name Sternrußtau ergibt sich aufgrund der Symptome, die er an befallenen Rosen verursacht. Der Erreger verursacht erst Chlorosen und dann Nekrosen, die sich sternförmig auf den Blättern ausbreiten. Die mit Sternrußtau befallenen Blätter fallen ab, wodurch sich die Pflanzenentwicklung verzögert. Die Bildung von neuen Trieben wird mit einer geringeren Frostresistenz in Verbindung gebracht. Einige Sorten verlieren ihre Blätter durch den Sternrußtau komplett und somit auch ihren Zierwert in den Gärten.

Taxonomie

Die Gattung *Diplocarpon* (Abbildung 1) umfaßt neben *D. rosae* fünf Arten die als Pflanzenpathogene hauptsächlich Wirte aus der Familie der *Rosaceae* besiedeln, wie z.B. *D. mali* auf *Malus* oder *D. earlianum* auf den Gattungen *Fragaria* und *Potentilla* (Hawksworth et al. 1995). Im Lebenszyklus von *D. rosae* dominiert die asexuelle Vermehrung des Pilzes (Abbildung 2). Diese beginnt ungefähr 24 bis 48 h nach der Infektion, mit der Keimung der Konidien in Wassertröpfchen auf den Rosenblättern (Drewes-Alvarez, 2003). Optimale Temperaturen für die Keimung und das anschließende Wachstum des Pilzes in seinem Wirt liegen bei 18 bis 21 °C (Frick, 1943). Die Konidien bilden Keimschläuche mit Appressorien und dringen durch die Kutikula in das Blatt ein. Nach ca. zwei Tagen beginnen die Hyphen sich zu verzweigen und penetrieren die Epidermiszellen. Ungefähr 7 bis 12 Tagen nach der Infektion bilden sich Acervuli, in denen die doppelzellige Konidien gebildet werden. Nach deren Freisetzung können diese dann neue Blätter infizieren. Der sexuelle Vermehrungszyklus des Pilzes wurde bisher nur sehr selten beobachtet (Frick, 1943; Knight und Wheeler, 1977 und 1978). Die Verbreitung des Sternrußtaus erfolgt vor allem durch die Übertragung der Konidiosporen durch Wassertropfen auf neue Wirtsblätter. Dazu müssen befallene Blätter, Pflanzen oder Pflanzenteile in die Nähe der neuen Wirte transportiert werden um dann eine Übertragung durch Spritzwasser zu ermöglichen.

Reich	<i>Fungi</i>
Unterreich	<i>Dikarya</i>
Stamm	<i>Ascomycota</i>
Substamm	<i>Pezizomycotina</i> O. E. Eriksson und K. Winka, 1997
Klasse	<i>Leotiomycetes</i> O. E. Eriksson und K. Winka, 1997
Ordnung	<i>Helotiales</i> Nannf., 1932
Familie	<i>Dermateaceae</i> Fr., 1849
Gattung	<i>Diplocarpon</i> F. A. Wolf
Art	<i>Diplocarpon rosae</i> F. A. Wolf

Abb. 1 Taxonomische Einordnung von *Diplocarpon rosae* (aus Lühmann 2010).

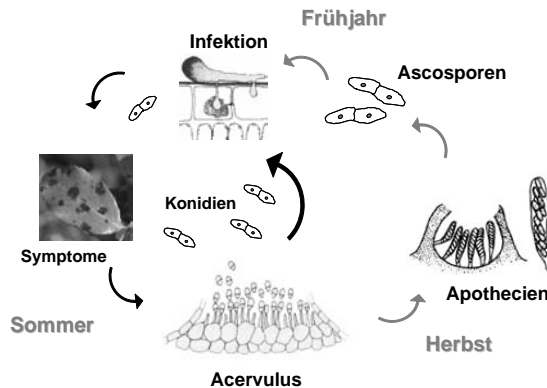


Abb. 2 Lebenszyklus von *Diplocarpon rosae*. Dargestellt ist sowohl der asexuelle (links) als auch der sexuelle (rechts) Vermehrungszyklus. (aus Lühmann, 2010)

Rassenstruktur

Für eine klare Unterscheidung physiologischer Rassen müssen die Untersuchungen mit Einsporisolen durchgeführt werden, um sicher zu stellen, dass die jeweiligen Reaktionen der Wirtspflanze nur durch einen Genotypen des Erregers ausgelöst wurden. Erste Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe wurden von Debener et al. (1998) durch Inokulationen eines Differentialsortiments von zehn verschiedenen Rosengenotypen mit 15 verschiedenen Einsporisolen aus Deutschland durchgeführt. Dadurch konnten 5 physiologische Rassen von *Diplocarpon rosae* voneinander differenziert werden. Unabhängig davon wurden bereits vorher vier Rassen in Kanada (Svejda und Bolton, 1980), sieben Rassen in Mississippi (Spencer und Wood, 1992 a, b), und später vier Rassen in England (Yokoya et al., 2000) charakterisiert. Dies geschah aber jeweils mit anderen Differentialsortimenten und Isolaten. Whitaker et al. (2010) verwendete viele bereits in diesen Arbeiten genutzte Einsporisolate und Rosengenotypen zusammen mit weiteren eigenen (Whitaker et al., 2007) und erstellte ein umfassendes Rassenschema (Abbildung 3). In eigenen aktuellen Analysen haben wir neun weitere Einsporisolate aus verschiedenen Ländern mit einem erweiterten Differentialsortiment nach Whitaker et al. (2010) untersucht. Dabei konnten wir zwei Isolate als neue Rassen definieren und sieben in das Rassenschema von Whitaker einordnen. Davon wurden fünf der Rasse 5 nach Whitaker zugeordnet. Zieht man aber die Ergebnisse mit nur drei weiteren Rosengenotypen in Betracht, so können von den fünf mindestens vier als weitere, andere Rassen definiert werden (Abbildung 3). Es zeigt sich also, dass mit einer Erweiterung der Isolatsammlungen von *D. rosae* und/oder einer Vergrößerung des Differentialsortiments immer mehr Rassen unterschieden werden können. Dies spricht für einen gewissen Prozentsatz an sexueller Fortpflanzung des Pilzes, die zu dieser Rassendiversität führt. Resistenzen gegen *D. rosae* sind vor allem in den Rosenarten zu finden. Unter diesen gibt es einige, die über mehrere Jahre im Feld und in künstlichen

Inokulationen, eine vollständige Resistenz gegen *D. rosae* zeigten. Hierzu zählen auch die tetraploiden Arten *R. bella*, *R. californica*, *R. caudata*, *R. majalis* und *R. nanthamnus* die für Einkreuzungen der Resistenz in die Kultursorten geeignet wären (Schulz et al., 2009). Es gibt allerdings auch unter den in den Differentialsortimenten getesteten Rosensorten einzelne, wie die Sorte 'Mrs. Doreen Pike', die gegen alle bisher verwendeten Isolate resistent sind. Hierbei handelt es sich um eine stark gefüllte, mehrfachblühende Sorte, die vom sonstigen Habitus sehr ähnlich zu *R. rugosa* ist.

	Br-26	Ab-13	Ab-8	X-104	X-130	X-51	X-122	K-967	X-105
Caramba	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Pariser-Charme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Heckenzauber	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Baby-Love	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Climbing-Allgold	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Mermaid	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mrs.-Doreen-Pike	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chorale	+	+	+	+	+	+	+	-	+
George-Vancouver	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Hansa	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Knockout	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Rasse-nach-Whitaker-etal.(2010)	2	5	5	5	5	5	10	neu	neu

	Br-26	Ab-13	Ab-8	X-104	X-130	X-51	X-122	K-967	X-105
93/27-02	-	-	-	+	+	-	+	-	-
88/124-46	-	+	+	-	-	-	-	+	-
93/99-01	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Rasse-nach-Kohlenberg(2011)	2	14-?	15-?	16-?	16-?	17-?	10	12	13

Abb. 3 Rassenstruktur von *D. rosae* (nach Kohlenberg, 2011)

Genetische Diversität

Neben der Identifizierung von Rassen haben wir uns auch mit der genetischen Diversität von *D. rosae* mit Hilfe von molekularen Markern beschäftigt. Dabei haben wir zum Einen detailliert die Diversität in großen Rosenpopulationen in Deutschland betrachtet, und zum Anderen angefangen die Diversität in weltweit gesammelten Stichproben zu vergleichen (Lüthmann, 2010). Für die Populationsanalysen in Deutschland haben wir ca. 950 Proben aus 13 Rosensammlung genommen. Für die meisten Populationen wurden zwei umfangreiche Proben in einem Zeitraum von drei Jahren genommen. Die Gendiversität nach Nei wurde für alle Proben nach der Analyse von 14 SSR Loci ermittelt (Abbildung 4). Aus den Ergebnissen der Analysen geht eindeutig hervor, dass sich das Alter der Rosenpopulation auf die Diversität der auf ihr wachsenden Sternrußtaupopulationen auswirkt. *D. rosae* Populationen aus den älteren Rosenbeständen, weisen auch die höchsten Gen-Diversitäten auf. Die Populationen mit den niedrigsten Gen-Diversitäten wurden auf den Testfeldern der Rosenzüchter gefunden. Dies lässt sich durch das geringe Alter der Rosenpopulationen auf diesen Felder erklären. Die Pflanzen bleiben zur Selektion auf diesen Feldern höchstens drei Jahre stehen, in den meisten Fällen sogar nur zwei Jahre. Zu den ältesten Rosenanpflanzungen gehört aber nicht nur die Rosensammlung aus Kassel-Wilhelmshöhe, auf der schon über 100 Jahre vor der neuen Bepflanzung im Jahr 1978 Rosen angebaut wurden, sondern auch die Sammlung des Europarosariums in Sangerhausen, das seit dem Jahr 1903 besteht. Die Gen-Diversität der Sternrußtaupopulation in Sangerhausen ist jedoch mit 0,14 eine der niedrigsten aller untersuchten Populationen. Das Alter der Wirtspopulation kann die Entwicklung der Diversität also nicht alleine erklären. Auch andere, relativ alte Sammlungen haben Sternrußtaupopulationen mit relativ geringen Gen-Diversitäten, wie z.B. die beiden Rosengärten in Hannover die seit 1951 bzw. 1966 bestehen. Die geringe Diversität in diesen alten Population ist mit großer Wahrscheinlichkeit durch den dort häufig stattfindenden Einsatz von Fungiziden bedingt. Im Vergleich dazu, wurden in Kassel-Wilhelmshöhe oder dem Testfeld in Ruthe (Hannover), seit Beginn der Neupflanzung

keinerlei Fungizide und auch keine anderen Pflanzenschutzmittel verwendet. Die Fungizide wirken als genetischer Flaschenhals auf die gesamte Pathogenpopulation. Nur ein kleiner Teil der Population bleibt nach der Anwendung von Fungiziden bestehen. Dieser besitzt dann eine wesentlich geringere genetische Diversität als die Ausgangspopulation.

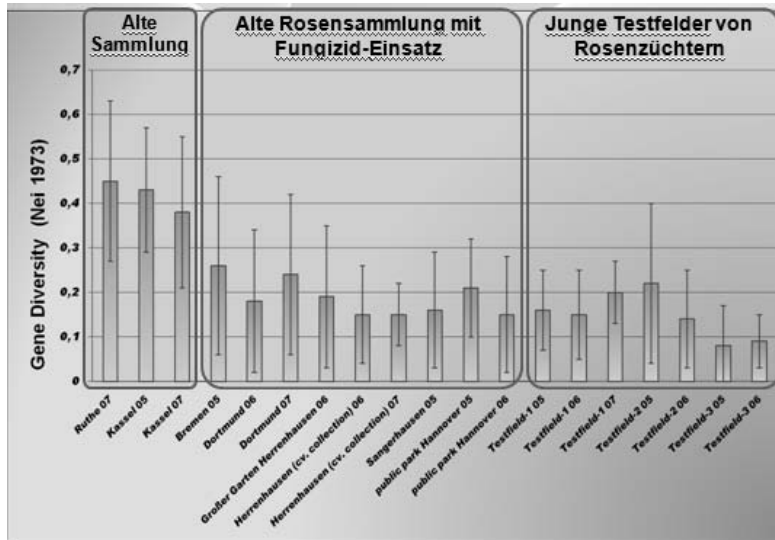


Abb. 4 Gen-Diversität nach Nei für *D. rosae* Proben aus Rosensammlungen in Deutschland

Um die weltweite Diversität des Pathogens *D. rosae* einschätzen zu können, wurden neben den Populationen innerhalb Deutschlands weltweit auch kleinere Populationen und einzelne Stichproben analysiert (Lühmann, 2010). Insgesamt wurden außerhalb Deutschlands 141 Proben in 12 Ländern gesammelt und später mit 13 SSR-Loci analysiert. Besonders auffällig ist, dass in keiner der Proben andere Bandenmuster aufgetreten sind, als die, die auch schon aus den SSR-Analysen von Populationen innerhalb Deutschlands sowie den Analysen der Einsporisolate bekannt waren. Daher kann darauf geschlossen werden, dass sich die Genotypen weltweit nicht besonders stark unterscheiden. Eine Verbreitung und Durchmischung, vor allem durch den Menschen, ist daher sehr wahrscheinlich. Genaue Angaben können bisher aber noch nicht gemacht werden, da teilweise nur kleine Stichproben gesammelt wurden.

Resistenzen und Resistenzgene

Bei der Resistenz gegenüber Pathogenen ist Grundsätzlich zwischen einer basalen bzw. horizontalen und einer spezifischen bzw. vertikalen Resistenz zu unterscheiden. Während es sich bei einer basale Resistenz meist um eine rassenunspezifische und meist nicht komplette, also quantitative, Resistenz handelt, kommt es bei einer vertikalen Resistenz zu einer spezifischen Interaktion von Produkten der Avirulenzgene (Avr-) im Pathogen mit den Produkten der Resistenzgene (R-) im Wirt. Sind korrespondierende Avr- und R-Gene in Pathogen und Wirt vorhanden, kommt es zu einer Resistenzreaktion im Wirt, die oft mit einer Hypersensitiven-Reaktion (HR) einhergeht. Dabei überlagern sich basale und spezifische Resistenzen in der Antwort des Wirts auf das Pathogen. Beide Typen der Resistenz wurden auch für die Interaktion von Rosen mit *D. rosae* gezeigt. Hinweise auf quantitative, basale Resistenz in Rosen gibt es z. B. durch die Untersuchungen von Xue und Davidson (1998), Bleichert und Debener (2005) und Whitaker und Hokanson (2009).

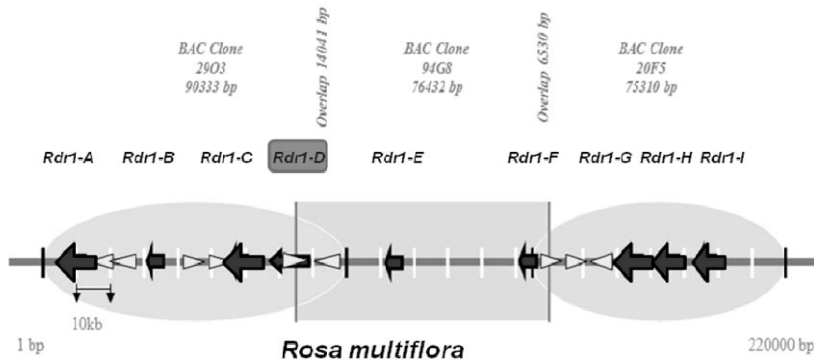


Abb. 5 Physikalische Position der *Rdr1* Genregion mit Anordnung der RGAs: Rote Pfeile repräsentieren die 9 RGAs die durch Sequenzanalyse auf diesen *R. multiflora* BACs erkannt wurden. Gelbe Dreiecke zeigen Copia-Elemente innerhalb dieses Intervalls. Die Pfeile und Dreiecke zeigen die Ausrichtung des RGAs und der Copia-Elemente im Contig

Aber auch Resistenzgene die eine spezifische Resistenz gegen einzelne Rassen von *D. rosae* vermitteln, wurden schon detailliert untersucht. Im Jahr 1998 (von Malek und Debener) wurde *Rdr1* (Resistenzgen *D. rosae* 1) als erstes Resistenzgen beschrieben. Dieses aus *R. multiflora* in tetraploide Gartenrosen eingekreuzte Gen, vermittelt eine Resistenz gegen das aus Deutschland stammende Isolat DortE4. Es wurde in der Folge detailliert in verschiedenen *R. multiflora* Hybridpopulationen molekular kartiert und charakterisiert. Mit Hilfe einer Bulk-Segregant-Analyse wurde eine Feinkartierung der Region um *Rdr1* mit 816 AFLP Primerkombinationen durchgeführt. Marker ohne Rekombination und in einer Distanz von 0,18cM um das Gen herum konnten dadurch lokalisiert werden (Hattendorf et al. 2004). In denselben Analysen konnte auch ein weiterer Resistenzloкус, *Rdr2*, der mit dem Isolat DüA3 interagiert, mit Hilfe der BSA kartiert werden. Dieser zeigte eine enge Kopplung an der *Rdr1* Locus, und wurde somit ebenfalls auf der Kopplungsgruppe 1 der Population 94/1 kartiert (Von Malek et al. 2000, Hattendorf et al. 2004). Mit Hilfe von degenerierten Primern konnten auch eine Reihe von Resistenzgenanaloga vom NBS-LRR-Typ in der Nähe dieser Resistenzgene und auf den anderen Kopplungsgruppen detektiert werden. In 2010 wurde dann das dritte Resistenzgen gegen Sternrußtau (*Rdr3*) von Whitaker et al. kartiert und publiziert. Dieses segregiert unabhängig von *Rdr1* und *Rdr2* und vermittelt eine Resistenz gegen ein Nordamerikanisches Isolat der Rasse 5. Ebenfalls mit Hilfe einer BSA konnten eng gekoppelte molekulare Marker von Whitaker et al. identifiziert werden.

Die weitaus meisten Erkenntnisse liegen für das 1998 erstmals beschriebene *Rdr1* Resistenzgen gegen die Rasse DortE4 vor (von Malek und Debener). In den folgenden Jahren wurde das Gen in zwei *R. multiflora* Populationen kartiert, und dem unteren Teil der Gruppe 1 zugeordnet (Hattendorf et al. 2004). Der *Rdr1* Locus wird durch mehrere Resistenz assoziierte Markern wie Resistenzgenanaloga (RGA, isoliert mit degenerierten Primern mit einem Kandidatengen-Ansatz) und von mehreren NBS Marker umgeben. Für die markergestützte Isolierung von *Rdr1* wurden weiterhin zwei große BAC-Bibliotheken für *R. rugosa* (Kaufmann et al., 2003) und *R. multiflora* aufgebaut. Diese resultierten in einem *R. multiflora* BAC Contig aus fünf überlappenden BACs von 250kb rund um den *Rdr1* Locus (Biber et al., 2010). Durch eine Feinkartierung mit den Inokulations- und Markerdaten von rund tausend Nachkommen konnten wir die Region rund um *Rdr1* auf ca. 0,1cM auf jeder Seite eingrenzen. *Rdr1* wurde dadurch auf den drei BAC-Klonen 2903, 94G8 und 20F5 des *R. multiflora* Genotyps 88/124-46, der homozygot für *Rdr1* ist, lokalisiert (Abb. 5). Diese drei BACs wurden nachfolgend vollständig sequenziert. Die Sequenzanalysen zeigten für den *Rdr1* Locus die Anwesenheit von neun RGAs des TIR-NBS-LRR-Typs (*muRdr1-A* bis *-I*) als mögliche Kandidaten für das Resistenzgen innerhalb einer 220kb Region (Terefe et al., 2010). Da die einzige bekannte Funktion von Genen dieser Klasse die Vermittlung einer Resistenz ist und kein anderer Resistenzgen mit

ähnlicher Sequenz konnte in der Region erkannt wurden, war anzunehmen, dass eines der 9 Gene das funktionellen *Rdr1*-Gens ist. Neben den neun RGAs wurde eine Reihe von Copia-Elementen in dieser Region des Genoms detektiert. *Rdr1-D* konnte Aufgrund der Sequenzinformationen als Kandidat ausgeschlossen werden, da es ein 7kb Retrotransposon im nicht codierenden Bereich seines ersten Intron enthielt (Kaufmann et al. 2010). Um das aktive *Rdr1* TIR-NBS-LRR Gen aus den 8 Kandidaten zu identifizieren, haben wir vier Ansätze parallel durchgeführt (Terefe et al. 2011): Als Erstes wurde ein RNAi-Silencing-Experiment der gesamten Genfamilie im resistenten *R. multiflora* Genotyp 91/100-5 durchgeführt. Das verwendete RNAi-Konstrukt hier basierte auf dem Vektor p9U10-RNAi. In dieses wurde ein 1098 bp-Fragment aus der hochkonservierten NBS Region von Exon 2 von *muRdr1-H* kloniert, das eine Ähnlichkeit von 86-96% zu alle anderen *muRdr1* Genen aufwies (lokale Ähnlichkeiten über Strecken > 100 bp wurden mehr als 95%). Mit dieser transienten Expression konnte allerdings kein komplettes Silencing der Genfamilie in dem resistenten Genotyp erreicht werden. Es zeigte sich zwar eine schwach anfällige Interaktion mit Hyphenwachstum, aber keine Bildung von Acervuli durch das Isolat DortE4 von *D. rosae*. Eine Behandlung des anfälligen Genotyps Pariser Charme mit diesem Konstrukt, rief eine signifikant erhöhte Anfälligkeit dieses Genotyps hervor. Man kann daher vermuten, dass auch in anfälligen Genotypen eine geringe quantitative Resistenz vorliegt, die wahrscheinlich durch überwundene Resistenzgene hervorgerufen wird. Zur Verringerung der Zahl der potentiellen *Rdr1*-Kandidaten, wurde als Zweites eine Expressionsanalyse der einzelnen Kandidatengene mit RT-PCR in verschiedenen Geweben (Blätter, Blüten und Wurzeln) der resistenten Rosengentypen 88/124-46 und 91/100-5 durchgeführt. Es wurden dazu spezifische und generelle Primer für all *muRdr1* Kandidaten auf cDNA der resistenten Genotypen angewendet. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass *muRdr1-A, C, G, H* und *I* in Blätter und Blüten exprimiert wurden, während *muRdr1-D, -E* und *-F* überhaupt keine Expression zeigten (Tabelle 1). Einer der Kandidaten, *muRdr1-B*, war nicht in Blütenblätter des Genotyps 88/124-46 exprimiert und gar nicht im Genotyp 91/100-5. Daher konnten mit *muRdr1-B, D, E* und *F* vier weitere Genkopien als mögliche Kandidaten für *Rdr1* ausgeschlossen werden.

Tab. 1 Expression der *Rdr1* Kandidatengene (CGs) A bis I in drei Geweben der resistenten *R. multiflora* Genotypen 88/124-46 und 91/100-5.

CGs	88/124-46			91/100-5	
	Leaves	Petals	Roots	Leaves	Petals
A	+	+	+	+	+
B	+	-	+	-	-
C	+	+	+	+	+
D	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-
G	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+
I	+	+	+	+	+

Als dritter Ansatz wurden Vollängenklone, inklusive der Regulationselemente im 5' und 3' Bereich der Gene, von 8 RGAs (ohne *Rdr1-D*) durch Restriktion der drei BAC-Klone (29O3, 94G8, 20F5) hergestellt. Die Sequenzen hatte eine Länge von ca. 10 bis 19 kb und enthielten 3kb der genomischen DNA oberhalb des putativen ATG Startcodons und > 900 bp unterhalb des putativen Stopcodons. Diese Klone wurden mit dem pBINPLUS-Vector in *E. coli* und *Agrobacterium* GV3101 transformiert. Alle 8 Kandidaten konnten

erfolgreich in *N. benthamiana* heterolog exprimiert und mit verschiedenen Primern nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass alle für die Expression nötigen Sequenzen im 5'- und 3'-Bereich der Klone vorhanden waren. Mit diesen Konstrukten in *Agrobacterium* GV3101 wurde dann eine transiente Komplementation des anfälligen Genotyps Paris Charme durchgeführt. Dazu wurden Blätter von Pariser Charme mit Hilfe einer Spritze mit einer Suspension aus Agrobakterien, welche jeweils eins der acht verschiedenen Konstrukte enthielten, und Konidien von dem Isolat DortE4 von *D. rosae* infiltriert. Als Kontrollen wurden zum Einen nur Konidien aus derselben Suspension infiltriert und zum Anderen Konidien zusammen mit Agrobakterien desselben Stamms, die ein GUS Konstrukt enthielten. In neun unabhängigen Experimenten wurden jeweils 20 Infiltrationen für jede der Behandlungen durchgeführt. Vier Tage nach Infiltration wurde das Wachstum von *D. rosae* DortE4 mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie an den entfärbten Blättern dokumentiert. In allen Experimenten gab es zur Keimung der Konidien und zum Wachstum von *D. rosae* Hyphenclustern im Blattgewebe. Es wurden dabei keine Unterschiede in der Morphologie der Hyphen festgestellt. In allen neun wiederholten Experimenten führte aber die Ko-Infiltration der Konidien mit *muRdr1-H* zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der Hyphencluster auf im Durchschnitt 54% im Vergleich zur GUS-Kontrolle (Abbildung 6). Hingegen zeigte das Konstrukt mit *muRdr1-A* nur in drei von neun Experimenten eine signifikante, aber geringere Reduktion der Anfälligkeit. In einem vierten experimentellen Ansatz bewirkte eine Ko-Infiltration von *muRdr1-H* mit einer anderen Rasse von *D. rosae* ebenfalls keine Reduktion der Anfälligkeit. Es zeigte sich in nachfolgenden Analysen auch kein additiver Effekt von *muRdr1-H* und *muRdr1-A*. Dies zeigt, dass *muRdr1-H* spezifisch mit dem Isolat *DortE4* interagiert, und das funktionelle *Rdr1* Gen ist, welches die Resistenz eines anfälligen Genotyps gegen diese Rasse wieder herstellt (Terefe et al. 2011).

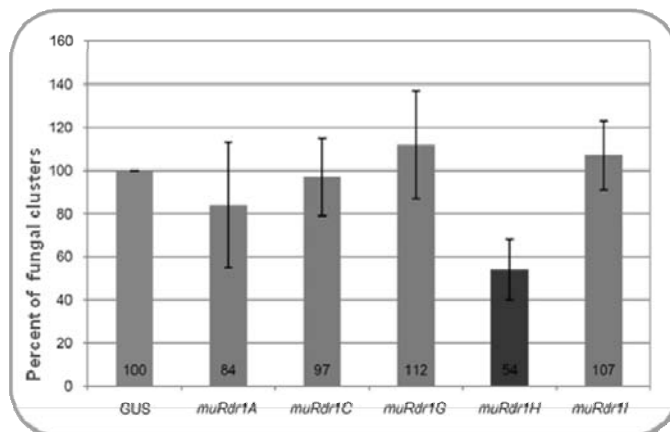


Abb. 6 Ergebnisse der Transienten Expression der verschiedenen *muRdr1* Konstrukte in Pariser Charme. Dargestellt ist der Prozentsatz an Hyphenclustern aus neun Wiederholten Experimenten in Vergleich zur GUS-Kontrolle.

Danksagung

Diese Arbeiten wurden unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Fördernummern DE 511/4-1 und DE 511/4-2. Ann-Katrin Lühmann wurde im Rahmen eines von der Aif geförderten Projekts unterstützt. Aneela Yasmin wurde gefördert durch ein Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD).

Literatur

- Biber, A., Kaufmann, H., Linde, M., Spiller, M., Terefe, D., und Debener, T. 2010: Molecular markers from a BAC contig spanning the *Rdr1* locus: a tool for marker-assisted selection in roses. *Theor. Appl. Genet.* **120**, 765–773.
- Blechert, O. und Debener, T., 2005: Morphological characterization of the interaction between *Diplocarpon rosae* and various rose species. *Plant Pathology* **54** (1) 82-90.
- Debener, T., Drewes-Alvarez, R. und Rockstroh, K., 1998: Identification of five physiological races of black spot, *Diplocarpon rosae*, Wolf on roses. *Plant Breeding* **117** (3), 267-270.
- Drewes-Alvarez, R., 2003: *Disease/Black spot*. In: Encyclopedia of rose science. Eds.: Roberts, A.V., Debener, T., Gudin, S., Oxford, Elsevier Academic Press.
- Frick, L., 1943: Untersuchungen über Biologie und Pathogenität von *Diplocarpon rosae* (*Lib.*) Wolf. *Phytopathol. Z.* **14**: 525-591.
- Hattendorf A, Linde M, Mattiesch L, Kaufmann H. und Debener T, 2004: Genetic analysis of rose resistance genes and their localization in the rose genome. *Acta Hort* **651**, 123–130
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler D.N., 1995: *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungus*. CAB International, Wallingford, UK.
- Knight, C. und Wheeler, B.E.J., 1978: *Germination of Diplocarpon-Rosae on Different Rose Cultivars*. *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology* **91** (4), 346-354.
- Knight, C. und Wheeler, B.E.J., 1977: *Perennation of Diplocarpon-Rosae on Rose Leaves*. *Transactions of the British Mycological Society* **69**, 385-389.
- Kaufmann H, Mattiesch L, Lörz H, Debener T, 2003: Construction of a BAC library of *Rosa rugosa* Thunb. and assembly of a contig spanning *Rdr1*, a gene that confers resistance to black spot. *Mol Genet Genomics* **268**, 666–674.
- Kaufmann, H., Yasmin, A., Biber, A., Terefe, D., Kühn, A. und Debener, T., 2010: Cloning and analysis of *Rdr1*, a black spot resistance gene from roses. *Acta Hort.* **870**, 191-196
- Kohlenberg, M., 2011: Molekulare und phytopathologische Charakterisierung von Sternrußtaurassen an Rosen. Bachelorarbeit Leibniz Universität Hannover
- Lühmann, A.-K. , 2010: Genetische Diversität des Sternrußtaus (*Diplocarpon rosae*) an Rosen. Dissertation Leibniz Universität Hannover
- Schulz, D.F., Linde, M., Blechert, O. und Debener, T., 2009: Evaluation of Genus *Rosa* Germplasm for Resistance to Black Spot, Downy Mildew and Powdery Mildew. *European Journal of Horticultural Science* **74** (1), 1-9.
- Spencer, J.A. und Wood, O.W., 1992a: Resistance of Selected Rose Cultivars to Variants of *Marssonina rosae* in Mississippi. *Journal of Environmental Horticulture* **10**, 235-238.
- Spencer, J.A. und Wood, O.W., 1992b: Response of Selected Old Garden Roses to Seven Isolates of *Marssonina rosae* in Mississippi. *Journal of Environmental Horticulture* **10**, 221-223.
- Svejda, F. J. und Bolton, A. T., 1980: Resistance of rose hybrids to three races of *Diplocarpon rosae*. *Canadian Journal of plant pathology* **2**, 23-25.
- Terefe, D., Biber, A., Yasmin, A., Kaufmann, H., und Debener, T., 2010: Comparative genomic analysis of sequences around the *Rdr1* locus in resistant and susceptible rose genotypes. *Acta Hort.* **870**, 197–204.
- Terefe, D., Yasmin, A., Le, T.L., Kaufmann, H., Biber A., Kühn, A., Linde, M. und Debener, T., 2010: Mining Disease-Resistance Genes in Roses: Functional and Molecular Characterization of the *Rdr1* Locus. *Frontiers in Plant Science* **2**, 1-12.
- Von Malek, B. und Debener, T., 1998: Genetic analysis of resistance to blackspot (*Diplocarpon rosae*) in tetraploid roses. *Theoretical and Applied Genetics* **96** (2), 228-231.
- Von Malek, B., Weber, W.E., Debener, T., 2000: Identification of molecular markers linked to *Rdr1*, a gene conferring resistance to black spot in roses. *Theoretical and Applied Genetics* **101** (5-6), 977-983.
- Whitaker, V. M. und Hokanson, S. C., 2009: Partial resistance to black spot disease in diploid and tetraploid roses: general combining ability and implications for breeding and selection. *Euphytica* **169** (3), 421–429.
- Whitaker, V.M., Bradeen, J.M., Debener, T. , Biber, A. und Hokanson, S.C., 2010: *Rdr3*, a novel locus conferring black spot disease resistance in rose: genetic analysis, LRR profiling, and SCAR marker development. *Theor. Appl. Genet.* **120**, 573-585.
- Xue A.G. und Davidson C.G, 1998: Components of partial resistance to black spot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf) in garden roses. *HortScience* **33** (1), 96-99.
- Yokoya, K., Kandasamy, K.I., Walker, S., Mandegaran, Z. und Roberts, A.V., 2000: Resistance of roses to pathotypes of *Diplocarpon rosae*. *Annals of Applied Biology* **136** (1), 15-20.