

---

# Anthracnose bei Rotklee: Ansätze zur Züchtung resistenter Sorten

Irene Jacob<sup>1)</sup> und Stephan Hartmann<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> LfL, Institut für Ökologischen Landbau, Bodenkultur und Ressourcenschutz,  
Lange Point 12, 85354 Freising

<sup>2)</sup> LfL, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 4,  
85354 Freising

Irene.Jacob@LfL.bayern.de

## Zusammenfassung

Der Rotkleeanbau in Deutschland könnte künftig durch eine Pilzkrankheit, der Anthracnose, erschwert werden. Um den Anbau weiterhin zu sichern, wurden die in Deutschland zugelassenen Rotkleesorten hinsichtlich ihrer Resistenz gegen die Krankheit in einer Prüfung im Gewächshaus evaluiert. Weiterhin wurde untersucht, ob man mit dem Verfahren der rekurrenten Selektion eine Anhebung des Resistenzniveaus bestehender Populationen erreichen kann. Zudem wurden molekulare Markeranalysen durchgeführt, die die Basis künftiger Züchtung durch markergestützte Selektion (MAS) bilden können.

## Summary

Southern Anthracnose, a disease of forage legumes caused by a fungus, could be a threat to red clover cultivation in Germany. To sustain the cultivation of red clover, varieties listed in Germany were evaluated concerning their resistance to the disease in a test in the greenhouse. Furthermore, the method of recurrent selection was analysed to be a suitable approach to improve resistance. Molecular marker analyses were conducted to provide a basis for future breeding using marker assisted selection (MAS).

## 1 Einleitung

Rotklee nimmt vor allem im ökologischen Landbau eine wichtige Rolle als Stickstofffixierer im Bereich der Fruchtfolge, aber auch als Proteinquelle für viehhaltende Wiederkäuerbetriebe ein. Besonders in Bayern, wo rund ein Drittel der Rotkleesaatgutvermehrung des Bundesgebietes stattfindet, ist ein beachtlicher Anbau entweder als Rein- oder als Mischanbau mit Gräsern zu finden.

Zunehmend kann das Auftreten der Anthracnose, einer samenbürtigen Krankheit an Futterleguminosen, die durch den Pilz *Colletotrichum trifolii* hervorgerufen wird, beobachtet werden. In Feldversuchen und in Zuchtgärten sind durch *C. trifolii* bereits erhebliche Ausfälle von Rotkleepflanzen beobachtet worden.

Die aussichtsreichste Strategie zur Vermeidung einer Ausbreitung der Krankheit bzw. zur Eindämmung im Falle eines gehäuften Auftretens auf Praxisflächen ist der Einsatz resistenter Sorten (Taylor 1985 [1], Boller et al. 1998 [2]). Ziele dieser Untersuchungen waren neben der Identifizierung resistenten Sortenmaterials auch die Erzeugung von neuem resistentem Material für die Züchtung sowie die Generierung von mit der Resistenz gekoppelten molekularen Markern.

## 2 Material und Methoden

Die Untersuchungen basieren auf dem modifizierten Gewächshausresistenztest nach Schubiger et al. 2003 [3] (Jacob et al. 2010 [4]).

Die Methode der rekurrenten Selektion wurde zur Verbesserung der Anthracnoseresistenz bereits bestehender Rotkleearten eingesetzt. Hierzu wurden überlebende Teilpopulationen ausgewählter Sorten aus der Prüfung im Gewächshaus ins Freiland gepflanzt. Es wurden jeweils 96 Pflanzen einer Ausgangspopulation unter einem Isolierzelt mit Hilfe von Hummeln sortenrein vermehrt. Nach ihrer Ernte wurden die so gebildeten nachfolgenden Generationen zusammen mit Pflanzen der Elternpopulation im Resistenztest geprüft. Dieser Zyklus wurde zweimal wiederholt.

Für die Markeranalysen wurden spaltende Populationen erzeugt, indem resistente mit anfälligen Rotkleepflanzen unter Isolierkäfigen im Gewächshaus paarweise durch Hummeln bestäubt wurden. Die so erzeugten F1-Generationen wurden durch den Resistenztest phänotypisch als resistent oder anfällig bewertet. Für die genetischen Analysen mittels einer Bulk Segregant Analysis (BSA) wurden je F1-Population gepoolte Proben, die aus gefriergetrocknetem Blattmaterial stammten, welches vor dem Resistenztest entnommen wurde, erstellt. Für die jeweiligen Populationen wurden fünf bis dreizehn Pflanzen zu acht bis dreizehn anfälligen bzw. resistenten Pools zusammengefasst. Das NucleoSpin® 96 Plant II Kit von Macherey-Nagel wurde zur DNA-Isolation aus den Pools verwendet. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit einem NanoDrop1000.

Es wurden 108 SSRs (Simple Sequence Repeats, Herrmann et al. 2006 [5], Kölliker et al. 2006 [6], Herrmann et al. 2008 [7]) und 64 SRAPs (Sequence Related Amplified Polymorphisms, Zhang et al. 2011 [8]) verwendet. Mit einem ABI 3100XL Sequencer wurden die PCR-Produkte aufgetrennt, deren Analyse erfolgte mit dem Programm GeneMarker® V1.91 von SoftGenetics®.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

Ergebnisse zum Sortenranking in Deutschland zugelassener Rotkleearten hinsichtlich der Anthracnoseresistenz sind bereits veröffentlicht (Jacob et al. 2010 [4]).

Die Untersuchungen zur Verbesserung des Resistenzniveaus durch rekurrente Selektion zeigten nach zwei Zyklen im Mittel der geprüften Populationen eine Erhöhung um 17 bzw. 26 Prozentpunkte der ersten bzw. zweiten Folgegeneration im Vergleich zur Ausgangspopulation (Abb. 1). Die größten Zunahmen der Resistenz erfolgten bei den beiden Sorten Lucrum und Kvarta, deren Ausgangspopulationen die geringste Resistenz aufwiesen. Hingegen ist bei der Sorte Pavo, bei der die Ausgangsresistenz bereits bei 83 % überlebender Pflanzen lag, nur eine tendenzielle Steigerung zu beobachten. Die Ergebnisse zeigen, dass bereits nach einem Zyklus der rekurrenten Selektion eine Steigerung der Re-

sistenz möglich ist. Allerdings ist auch bei einem sich anschließenden zweiten Zyklus noch eine Anhebung des Resistenzniveaus zu erwarten. Beispielsweise zeigte die Sorte Kvarta erst nach dem zweiten Zyklus eine deutliche Verbesserung in dem Merkmal.

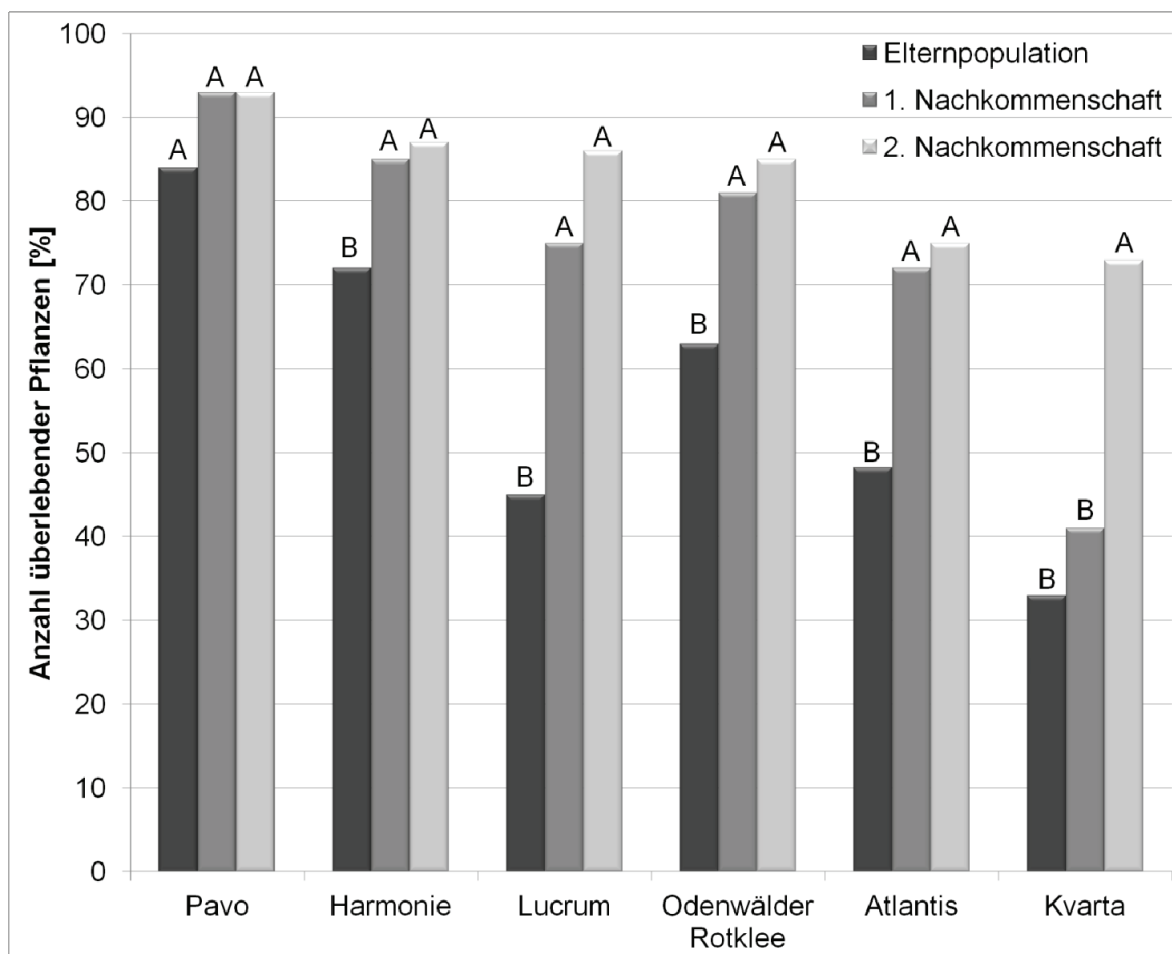


Abb. 1: Anzahl überlebender Pflanzen nach zwei Zyklen rekurrenter Selektion. Mittelwertvergleich verschiedener Generationen innerhalb der Selektionspopulation, gleiche Buchstaben zeigen nicht-signifikante Unterschiede, Simulate-Test,  $P < 0,05$ .

Bei der genetischen Analyse der im Merkmal „Anthracnosresistenz“ spaltenden Populationen wurde bei einem der insgesamt 108 getesteten SSR-Marker eine enge Kopplung festgestellt. Hierzu dauern die Untersuchungen hinsichtlich der Kartierung des Markers noch an.

#### 4 Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen lässt sich ableiten, dass für den Anbau in Deutschland Sorten gelistet sind, die eine Resistenz gegen *C. trifolii* aufweisen.

Außerdem wurde gezeigt, dass sich die Anthracnoseresistenz einer Rotkleepopulation durch die Methode der rekurrenten Selektion erheblich steigern lässt.

Ein eng mit der Resistenz gekoppelter genetischer Marker wurde identifiziert.

Die Förderung des Forschungsvorhabens erfolgte aus Mitteln des BÖLN unter dem FKZ 2806OE161.

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] Taylor N. L. (ed.) (1985): Clover science and technology. Amer. Soc. Agron. Madison, WI.
- [2] Boller B., Bigler P., Bucanovic I., Bänziger I. (1998): Southern Anthracnose – a new threat for red clover persistence in cooler regions? In: Boller B., Stadelmann F.J. (eds): Breeding for a Multifunctional Agriculture. Proc. 21st Meet. Fodder Crops and Amenity Grasses Section of EUCARPIA, Switzerland, 195-198.
- [3] Schubiger F.X., Streckeisen P., Boller B. (2003): Resistance to Southern Anthracnose (*Colletotrichum trifolii*) in Cultivars of Red Clover (*Trifolium pratense*). Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 39 (Special Issue), 309-312.
- [4] Jacob I., Hartmann S., Schubiger F.X., Struck C. (2010): Genetic diversity of red clover varieties listed in Germany concerning the resistance to Southern Anthracnose. Grassland Science in Europe, Vol. 15, 344-346.
- [5] Herrmann D., Boller B., Studer B., Widmer F., Kölliker R. (2006): QTL analysis of seed yield components in red clover (*Trifolium pratense L.*). Theor Appl Genet 112, 536-545.
- [6] Kölliker R., Enkerli J., Widmer F. (2006): Characterization of novel microsatellite loci for red clover (*Trifolium pratense L.*) from enriched genomic libraries. Molecular Ecology Notes 6, 50-53.
- [7] Herrmann D., Boller B., Studer B., Widmer F., Kölliker R. (2008): Improving Persistence in Red Clover: Insights from QTL Analysis and Comparative Phenotypic Evaluation. Crop Science, Vol. 48, 269-277.
- [8] Zhang F., Chen S., Chen F., Fang W., Chen Y., Li F. (2011): SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*). Mol Breeding 27, 11-23.