

**Genetische und molekulare Charakterisierung  
der Resistenz des Apfels gegen den Echten Mehltau  
und der Virulenz des Erregers  
*Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm.**

Von dem Fachbereich Gartenbau  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Gartenbauwissenschaften  
- Dr. rer. hort. -

Genehmigte Dissertation

von  
Dipl.-Ing. agr. Annette Urbanietz  
Geboren am 11.01.1971 in Hannover

**2002**

**Referent:**

**Prof. Dr. Grunewaldt**

**Koreferent:**

**Prof. Dr. Schönherr**

**Tag der Promotion:**

**10. Juli 2002**

## Zusammenfassung

Die Entwicklung dauerhaft resistenter Apfelsorten ist ein wichtiges Ziel in Apfelzuchtprogrammen weltweit. Im Rahmen des von der E.U. geförderten Projekts "Durable Apple Resistance in Europe" („D.A.R.E.", URBANIETZ et al., 1999) sollte deshalb ein Beitrag zur Schaffung dauerhaft mehltaresistenter Apfelsorten geleistet werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neben der Charakterisierung von Resistenzquellen, sowie der Kartierung und Entwicklung molekularer Marker für das Mehltaresistenzgen  $Pl_1$ , auch die Variabilität der Virulenz des Erregers, *Podosphaera leucotricha*, zu charakterisieren.

Um den für die Mehltaresistenz-Züchtung zur Verfügung stehenden Genpool zu erweitern, wurde ein Testsortiment, bestehend aus 27 zumeist älteren Kultursorten und 14 Wildarten oder Wildartderivaten, unter hohem Befallsdruck kultiviert. Nach drei Befallserfassungsjahren konnten Aussagen über den Resistenzgrad der untersuchten Genotypen gemacht werden. Neben der zumeist monogen bedingten Resistenz von 11 Wildarten bzw. Wildartderivaten sind auch drei Kultursorten, deren Resistenz vermutlich polygen bedingt ist, befallsfrei geblieben. zehn weitere Kultursorten und eine Wildart wurden als "feldresistent" eingestuft. Sowohl resistente als auch feldresistente Genotypen könnten als Kreuzungspartner im Rahmen einer Züchtung auf Mehltaresistenz eingesetzt werden.

Das "Pyramidisieren" verschiedener Resistenzgene ist eine züchterische Strategie, um die Dauerhaftigkeit monogen bedingter Resistenzen zu verbessern. Zur sicheren Unterscheidung der beteiligten Resistenzgene sind eng gekoppelte molekulare Marker unverzichtbar. Unter Verwendung einer AFLP-gestützten 'Bulked-Segregant-Analyse' konnten Marker im Bereich von 37 cM um das Mehltaresistenzgen  $Pl_1$  kartiert werden. Zwei der Marker waren deutlich enger an das Zielgen gekoppelt als ein zu Beginn dieser Arbeit vorliegender SCAR-Marker. Um für die markergestützte Selektion einfach handhabbare Marker bereitzustellen, wurden einer der beiden AFLP-Marker in einen SCAR- sowie einen CAPS-Marker umgewandelt. Der SCAR-Marker AU1b-SCAR sowie der CAPS-Marker AU1a-CAPS können im Rahmen von markergestützten Selektionsverfahren eingesetzt werden.

Zur sicheren Bewertung der Resistenz verschiedener *Malus*-Genotypen sind auch genaue Kenntnisse hinsichtlich der Virulenz des Erregers erforderlich. Um die Existenz

physiologischer Rassen von *Podosphaera leucotricha* nachzuweisen, sind Einsporisolate des Pathogens von sechs verschiedenen Standorten innerhalb Europas erstellt, langfristig erhalten und sowohl molekular als auch phytopathologisch charakterisiert worden. Die Kultur von Einsporisolaten erfolgte auf *in vitro*-Sprossen der hochanfälligen Sorte 'Gibb's Golden Gage'. Die molekulare Charakterisierung der 31 etablierten Isolate unter Verwendung der AFLP-Technik zeigte eine nur sehr geringe Variabilität von weniger als 1 %, welches die fehlende Bedeutung der sexuellen Phase an der Verbreitung des Pathogens widerspiegelt. Das auf der Basis von 54 stabil reproduzierbaren AFLP-Markern erstellte Dendrogramm zeigt die genetische Vielfalt innerhalb des Standorts Ahrensburg sowie zwischen verschiedenen europäischen Standorten. Auf Grund ihrer genetischen Distanz wurden sechs der Isolate für eine anschließende phytopathologische Charakterisierung ausgewählt. Inokulationsversuche an Einzelblättern in einem Inokulationsturm führten zu einem *Malus*-Differentialsortiment, welches eine Unterscheidung von fünf der sechs Isolate aufgrund ihrer unterschiedlichen Virulenz ermöglicht. Damit konnte gezeigt werden, dass beim Erreger des echten Mehltaus am Apfel, *Podosphaera leucotricha*, physiologische Rassen existieren.

SCHLAGWORTE: Apfel  
Mehltauresistenz  
Molekulare Marker  
*Podosphaera leucotricha*

## Summary

The development of apple varieties displaying durable resistance is one of the major aims in apple breeding programmes worldwide. Within the E.U. project "Durable Apple Resistance in Europe" ("D.A.R.E.", URBANIETZ, et al., 1999) the aim of this work was to contribute to the creation of durable mildew-resistant apple varieties. Besides the characterisation of resistance sources and the mapping and development of molecular markers for the powdery mildew resistance gene  $Pl_1$  the variability of the virulence of the pathogen, *Podosphaera leucotricha*, was characterized as well.

To enlarge the pool of resistance genes that can be used in apple breeding a test collection, consisting of 27 older apple varieties and 14 wild species or their derivatives, was cultivated under high infection pressure. After three years of mildew assessment it was possible to classify the genotypes due to their level of resistance. Besides the generally monogenic resistance of 11 wild species or their derivatives there are also three varieties that remained resistant up to date. The resistance of these varieties is supposed to be polygenic. Ten additional varieties and one wild species have been classified as "field resistant". Both resistant and field resistant genotypes may be used in future mildew resistance breeding programmes.

The "pyramiding" of different resistance genes is a breeding strategy to prolong the durability of monogenetic resistances. For the identification of the different resistance genes within one genotype tightly linked molecular markers are inevitable. By using a AFLP-based "Bulked-Segregant-Analysis" several markers within a region of 37 cM around the mildew resistance gene  $Pl_1$  have been mapped. Two of them were more closely linked to the gene than the one marker identified previously to the present work. To design markers that are easily applicable in marker-assisted apple breeding programmes one of the two tightly AFLP-markers was converted into a SCAR-marker and a CAPS-Marker. The SCAR-marker AU1b-SCAR and the CAPS-Marker AU1a-CAPS are ready to be used in marker-assisted selection programmes.

For a reliable judgement of the resistance of different *Malus* genotypes an extended knowledge about the virulence of the pathogen is necessary. To prove the existence of physiological races of *Podosphaera leucotricha* monoconidial isolates of the fungus representing six different locations within Europe have been established and maintained over a longer period. They have been characterized using phytopathological tests as well as molecular marker techniques. Monoconidial isolates were maintained on *in vitro*-shoots

of the highly susceptible variety 'Gibb's Golden Gage'. The molecular characterisation by using the AFLP-technique of the 31 isolates that have been established visualized a very small genetic variability of below 1% that reflects the lack of importance of the sexual phase for the spread of the pathogen. By using 54 stably reproducible AFLP-markers a genealogical tree was designed. It displays the genetic variability within the local population in Ahrensburg as well as the genetic variability between different locations in Europe. Due to their genetic distance six monoconidial isolates have been chosen for further phytopathological studies. Inoculation tests in an inoculation tower using detached leaves resulted in a differential test set of *Malus*-genotypes which allows the differentiation of five of the six isolates by their virulence pattern. That result demonstrates the existence of physiological races of *Podosphaera leucotricha*, the pathogen that causes powdery mildew on apples.

KEY WORDS:        Apple  
                      powdery mildew resistance  
                      molecular markers  
                      *Podosphaera leucotricha*

<b><u>Inhaltsverzeichnis</u></b>	<b><u>Seite</u></b>
<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Material und Methoden</b>	8
2.1. <b><u>Charakterisierung neuer Mehltaresistenzquellen</u></b>	8
2.2. <b><u>Kartierung des Resistenzgens <math>Pl_1</math></u></b>	9
2.2.1. <b>Kartierungspopulation</b>	9
2.2.1.1. Ausgangsmaterial	9
2.2.1.2. Erstellung der Kartierungspopulation	10
2.2.1.3. Kultur der Kartierungspopulation	11
2.2.1.4. Erfassung des Mehltaubefalls	11
2.2.2. <b>Molekulare Analysen</b>	12
2.2.2.1. DNA-Isolierung	12
2.2.2.2. Molekulare Verifikation der Resistenz	12
2.2.2.3. AFLP-gestützte "Bulked-Segregant-Analyse"	14
2.2.2.4. Erstellen einer Kopplungskarte für $Pl_1$	17
2.2.2.5. Umwandlung von AFLP-Markern in SCAR-Marker	17
2.2.2.5.1. Klonieren von AFLP-Fragmenten	17
2.2.2.5.2. Sequenzanalyse von AFLP-Fragmenten	19
2.2.2.5.2.1. Plasmid-Präparation	19
2.2.2.5.2.2. Sequenzierung	19
2.2.2.6. SCAR-Marker	20
2.2.2.7. CAPS-Marker	21
2.3. <b><u>Charakterisierung von <i>Podosphaera leucotricha</i></u></b>	22
2.3.1. <b><i>In vitro</i> - Kultur von <i>Malus</i>- Wirtspflanzen</b>	22
2.3.2. <b>Kultur von <i>Podosphaera leucotricha</i></b>	22
2.3.2.1. Erstellen von Einsporisolaten	23
2.3.2.2. Kultur von Einsporisolaten	23

	<b><u>Seite</u></b>
2.3.3. <b>Molekulare Charakterisierung</b>	24
2.3.3.1. DNA-Isolierung	24
2.3.3.1.1. PEX-Protokoll	24
2.3.3.1.2. CTAB-Protokoll	24
2.3.3.2. RAPD-Analyse	25
2.3.3.3. AFLP- Analyse	26
2.3.3.4. Erstellen eines genetischen Stammbaums	26
2.3.4. <b>phytopathologische Charakterisierung</b>	27
2.3.4.1. Auswahl der Isolate	27
2.3.4.2. Pflanzenmaterial	27
2.3.4.3. Inokulation von Zweigen	27
2.3.4.4. Inokulation von Einzelblättern	28
<b>3. Ergebnisse</b>	30
3.1. <b><u>Charakterisierung neuer Resistenzquellen</u></b>	30
3.2. <b><u>Kartierung des Resistenzgens <math>PI_1</math></u></b>	33
3.2.1. <b>Befallsanalyse</b>	33
3.2.2. <b>“Bulked-Segregant-Analyse”</b>	34
3.2.3. <b>Kopplungskarte für <math>PI_1</math></b>	37
3.2.4. <b>SCAR-Marker-Entwicklung</b>	39
3.2.5. <b>CAPS-Marker-Entwicklung</b>	43
3.3. <b><u>Charakterisierung von <i>Podospaera leucotricha</i></u></b>	45
3.3.1. <b>Erstellung von Einsporisolaten</b>	45
3.3.2. <b>Molekulare Charakterisierung</b>	47
3.3.3. <b>Phytopathologische Charakterisierung</b>	50

	<b><u>Seite</u></b>
<b>4. Diskussion</b>	55
4.1. <b><u>Charakterisierung neuer Resistenzquellen</u></b>	55
4.2. <b><u>Kartierung des Resistenzgens Pl<sub>1</sub></u></b>	58
4.3. <b><u>Entwicklung spezifischer Marker für Pl<sub>1</sub></u></b>	63
4.4. <b><u>Charakterisierung von Podosphaera leucotricha</u></b>	65
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	78
<b>6. Anhang</b>	83
6.1. <b><u>Testsortiment zur Selektion neuer Resistenzquellen</u></b>	83
6.1.1. <b>Herkunft und Befallserwartung</b>	83
6.1.2. <b>Befallserfassung an verschiedenen Standorten</b>	84
6.2. <b><u>Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen</u></b>	85
6.3. <b><u>Nährmedien zur <i>in vitro</i>-Kultur</u></b>	87
6.4. <b><u>Inokulationstests</u></b>	88
6.5. <b><u>Befallserfassung und Markeranalyse von 99/2</u></b>	90



## Abkürzungsverzeichnis

AFLP	Amplified Restriction Length Polymorphism
bp	Basenpaare
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
cM	Centimorgan
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
M	Mol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RAPD	Random Amplifies Polymorphic DNA
RNAse	Ribonuclease
SCAR	Sequense-Characterized Amplified Region
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylendiamin
Tris	Tetramethylammoniumchlorid



## 1. Einleitung

Echter Mehltau, verursacht durch den obligat biotrophen Ascomyceten *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm., gehört neben Apfelschorf (*Venturia inaequalis*) zu den wirtschaftlich bedeutendsten pilzlichen Pathogenen im Erwerbs-Apfelanbau (KOTTE, 1958; ZELLER, 1889; SCHEEWE, 1990; KRÜGER, 1995; MARKUSSEN; 1996; SEGLI-AS-HODEL, 1997). Der Erreger wurde erstmals vor rund 200 Jahren in Nordamerika beobachtet (ZELLER, 1989) und tritt heute weltweit in allen warmen, vorwiegend sommertrockenen Anbaugebieten auf. Insbesondere großflächige geschlossene Anlagen mit hoher Bestandesdichte schaffen günstige Infektionsbedingungen für den Erreger. Bei starkem Befall muss nach FRIEDRICH und RODE (1996) mit Ertragsverlusten von bis zu 40 % gerechnet werden. Eine Infektion setzt die Photosyntheseleistung und Transpiration der Pflanze herab, was eine verringerte Reservestoffbildung und gestauchtes Sprosswachstum zur Folge hat (ELLIS et al. 1981). Die Ertragsausfälle beruhen auf einem allgemeinen Vitalitätsverlust der Pflanze sowie dem Primärbefall von Blütenknospen und einem mit dem gestauchten Triebwachstum einhergehenden verringerten Blütenknospenansatz (SCHANDER, 1958). Eine direkte Schädigung der Frucht wird dagegen nur sehr selten beobachtet (BLUMER, 1967; WINTER et al., 1992).

Als obligat biotropher Parasit ist *Podosphaera leucotricha* in seinem Vorkommen an lebendes Gewebe der Gattung *Malus* gebunden. Gelegentlich wird auch eine schwache Infektion von Pflanzen der Gattungen *Pyrus*, *Cydonia*, *Prunus*, *Photinia Crataegus* und *Spiraea* erwähnt (BLUMER, 1967; WARTENBERG, 1960; BRAUN, 1995). MWANZA und WAITHAKA (2001) berichten über einen in den letzten Jahren in Kenia erstmals aufgetretenen Befall von *Podosphaera leucotricha* auf *Prunus africana*.

In den gemäßigten Klimagebieten Europas, Nordamerikas oder Neuseelands erfolgt die Überwinterung des Erregers hauptsächlich als Mycel in den Knospen der Wirtspflanze. Eine Infektion setzt die Kältetoleranz der betroffenen Knospen herab und vergrößert somit die Gefahr von Frostschäden in kalten Wintern (SPOTTS et al., 1981; ZELLER, 1989). Als Primärbefall überwuchert überwintertes Mycel im Frühjahr den jungen Austrieb. Befallsmindernd wirkt sich zu diesem Zeitpunkt vor allem ein Befall von Blütenknospen aus, denn infizierte Blütenbüschel entwickeln sich langsa-

mer als gesunde, die Blütenstiele sind verdickt und verkürzt und die Blüte verkümmert (BÖMEKE, 1978).

Konidien des Erregers werden vom Mycel der Primärinfektion abgeschnürt und mit dem Wind verbreitet. Dadurch kommt es zur Neuinfektion junger Blätter und Triebe. Das Maximum dieses Sekundärbefalls, und damit auch die Hauptbefallszunahme, liegt in den Monaten Mai bis Juli. In dieser Zeit werden beständig große Mengen an Konidien gebildet und durch das Wachstum der Bäume besteht ein Überfluss an infizierbaren jungen Trieben und Blättern (WINTER et al., 1992). Ausgewachsene Blätter dagegen können vom Erreger im allgemeinen nicht mehr infiziert werden (SCHANDER, 1958; ELLIS et al., 1981). Diese ontogene Resistenz wurde auch beim Echten Mehltau der Weinrebe beobachtet (DOSTER und SCHNATHORST, 1985), während die Erreger des Echten Mehltaus an Gurke und Erbse (KOTTE, 1958), Melone (HOSOYA et al., 1999) oder Poinsettia (CELIO und HAUSBECK, 1998) auch ältere Blätter infizieren können.

Der tägliche Konidienflug wird durch die morgendliche Abnahme der Luftfeuchte ausgelöst. Optimale Infektionsbedingungen herrschen bei Temperaturen von 20 bis 25°C (SUTTON und JONES, 1979; GOSZYNKI und CIMANOWSKI, 1985; XU und BUTT, 1998).

Die nur selten auftretende Hauptfruchtform scheint für die Verbreitung von *Podosphaera leucotricha* keine große Bedeutung zu haben (BÖMEKE, 1978). Zwar scheint die Entwicklung von Cleistothecien mit der Anfälligkeitsstärke des Wirtsgenotypen korreliert zu sein (BLUMER, 1967), aber in Inokulationsversuchen konnte mit Ascosporen in der Mehrzahl der Fälle keine Infektion erzielt werden (SCHANDER, 1958; KOTTE, 1958; BLUMER, 1967; BRAUN, 1995). Bisher konnten nur TSUYAMA et al. (1967) eine Infektion mit Ascosporen unter kontrollierten Bedingungen erfolgreich durchführen. Es wird deshalb insgesamt von einer weitgehend asexuellen Verbreitung des Erregers ausgegangen (KOTTE, 1958; ALEXOPULOS, 1966; BLUMER, 1967; BÖHMEKE, 1978; ZELLER, 1989; FRIEDRICH und RODE, 1996).

Im derzeit anbaurelevanten Sortenspektrum stellt Anfälligkeit für Echten Mehltau ein großes Problem dar. Sorten wie 'Gala', 'Golden Delicious' oder 'Jonathan' beispielsweise können in der Mehrzahl der Anbauggebiete nicht ohne intensiven Fungizidein-

satz kultiviert werden. Mehltaresistenz gehört deshalb in der Apfelzüchtung weltweit zu den wichtigsten Zuchtzielen.

Nach FRIEDRICH und RODE (1996) sollten für eine gezielte züchterische Bearbeitung des Merkmals Resistenz in der Obstzüchtung folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Anfälligkeitsprüfung großer Sortimente
2. Vorhandensein von genetisch bedingten Befallsunterschieden innerhalb des Zuchtmaterials
3. Vorhandensein einer effektiven Resistenzprüfmethode
4. Herstellung und Testung großer Nachkommenschaften
5. Genaue Kenntnisse über die Genetik der bearbeiteten Resistenzen
6. Einsatz von Massenselektionsverfahren.

Die Autoren heben besonders hervor, dass ein Züchterfolg maßgeblich davon abhängt, inwieweit es gelingt, neben der Resistenz des Wirtes auch die Virulenz des Erregers im Zuchtprozess zu berücksichtigen. Um Mehltaresistenz im Sortenspektrum des Apfels dauerhaft zu etablieren ist es deshalb notwendig, neue Wege in der Züchtung zu beschreiten.

Apfelzüchter auf der ganzen Welt nutzen aktuell nur einen sehr begrenzten Ausschnitt der zur Verfügung stehenden genetischen Variabilität des Genpools "*Malus*" für die Züchtung (WAY, 1990; ORAGUZIE et al., 2001a und b). Die wenigen züchterisch bearbeiteten Resistenzen entstammen fast ausschließlich Wildarten und sollen zumeist auf einzelnen Majorgenen beruhen (GALLOTT et al., 1985). Am Beginn neuer Züchtungsprojekte sollte deshalb die Erweiterung des genutzten Genpools durch Charakterisierung von möglichst vielen unterschiedlichen Resistenzquellen stehen.

Zwei der wichtigsten Quellen von Mehltaresistenz sind *Malus robusta* MAL59 und *Malus zumi* MAL 68, welche von KNIGHT und ALSTON (1968) aus einer Sammlung frei abgeblühter Wildarten selektiert worden sind. Die Resistenzen werden als  $Pl_1$  (*M. robusta*) und  $Pl_2$  (*M. zumi*) bezeichnet. Die Ergebnisse damaliger Feldversuche deuteten bei beiden Resistenzen zunächst auf einen monogen dominanten Erbgang hin. Weitergehende Versuche ließen ALSTON (1976) zu dem Schluss kommen, dass an beiden Resistenzen jeweils mindestens zwei Majorgene beteiligt sein müssen, was

auch von DAYTON (1977) postuliert worden ist. Weil gezielte genetische Studien jedoch nicht durchgeführt worden sind, konnte der Beweis für diese Hypothese bis heute nicht geführt werden. So sind beispielsweise SCHMIDT (1994) und MARKUSSEN et al. (1995) im Bezug auf  $Pl_1$  von einem monogen dominanten Erbgang ausgegangen.  $Pl_1$  und  $Pl_2$  werden aufgrund ihrer einfachen Vererbung in Zuchtprogrammen auf der ganzen Welt eingesetzt.

Weitere, wahrscheinlich monogen bedingte Resistenzen treten in der Sorte 'White Angel' ( $Pl_w$ ) (GALLOT et al., 1985; HEMMAT et al., 1994; BATLLE und ALSTON, 1996), und dem Klon D12 ( $Pl_d$ ) (VISSER und VERHAEGH, 1979; ALSTON, 1983) auf. Ein Sämling eines frei abgeblühten 'Starking Delicious' erwies sich ebenfalls als hochgradig resistent. Man bezeichnete den Genotyp als "Mildew Immune Seedling" (M.I.S.). Vererbungsstudien deuten auch bei dieser Resistenz auf ein starkes Majorgen hin (DAYTON, 1977; ALSTON, 1983). KORBAN und DAYTON (1983) berichteten über erste Anzeichen, dass diese Resistenz in den U.S.A. bereits einmalig von *Podosphaera leucotricha* durchbrochen sein worden könnte. Ein Befall von M.I.S. ist seitdem jedoch nicht wieder aufgetreten, so dass diese Resistenz weiterhin als stabil eingestuft werden kann.

Starke Resistenzen sind in vielen Wildarten wie beispielsweise *Malus sargentii*, *Malus baccata*, *Malus hupehensis*, *Malus coronaria*, *Malus sieboldii* und *Malus trilobata* (KNIGHT und ALSTON, 1968, FISCHER et al., 1984; WAY et al., 1990) enthalten. Durch Testkreuzungen kann man Aufschluss über die genetische Basis dieser Resistenzen erhalten. Nachteilig bei der Verwendung von Malus-Wildarten in der Züchtung sind die meist sehr negativen Fruchteigenschaften, die durch Rückkreuzungen mit Kultursorten verdrängt werden müssen. Dadurch verlängert sich der Zuchtprozess erheblich (LESPINASSE, 1976; FISCHER, 1994b; SCHMIDT, 1994).

Die eingeschränkte Variabilität im Sortenspektrum moderner Obstanlagen schafft einen hohen Selektionsdruck für das Pathogen hinsichtlich der Überwindung von Resistenz (MACHARDY et al., 2001). Die Verwendung von monogen bedingten Resistenzen in der Züchtung birgt deshalb ein hohes Risiko der Überwindung durch neue Pathotypen des Erregers. Beispielsweise ist eine in den Obstanlagen des Instituts für Zierpflanzenzüchtung in Ahrensburg erstmals aufgetretene neue Rasse des Erregers des Apfelschorfs (*Venturia inaequalis*) in der Lage, die züchterisch stark bearbeitete  $V_F$ -Resistenz aus *Malus floribunda* 821 zu überwinden (PARISI et al., 1993).

Die Überwindung der wenigen bisher in der Apfelzüchtung eingesetzten monogen bedingten Mehltaresistenzen ist bisher, bis auf den für M.I.S. beschriebenen Fall, noch nicht eingetreten. Wegen des hohen Zeitaufwandes in der Apfelzüchtung ist es aber sinnvoll, Maßnahmen zu ergreifen, welche die Gefahr der Überwindung monogen bedingter Mehltaresistenzen durch den Erreger minimieren. Neben der Akkumulation unterschiedlicher Resistenzen in einem Genotyp, dem "Pyramidisieren" von Resistenzgenen, ist auch das Einkreuzen von polygen bedingten Resistenzen von großer Bedeutung.

Polygen bedingte Resistenzen gegenüber *Podosphaera leucotricha* werden in vielen Kultursorten vermutet (ALSTON, 1969, LESPINASSE et al., 1976; NORTON, 1981; KORBAN und RIEMER, 1990; KRÜGER, 1994). Eine genaue Charakterisierung dieser Kultursorten hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften könnte sie daher als potentielle Resistenzquellen für die Züchtung erschließen.

Eine wichtige Strategie zur Etablierung dauerhaft mehltaresistenter Apfelsorten ist das "Pyramidisieren" vieler unterschiedliche Resistenzen in einem Genotyp (FISCHER, 1994a und b; KELLERHALS und FURRER, 1994 BUS et al., 2000). Damit soll erreicht werden, dass es für den Erreger nicht mehr möglich ist, die dadurch multigen bedingte Resistenz zu überwinden.

Um einzelne Resistenzen in ihrem Wirkungsspektrum genau einschätzen zu können, reicht es nicht aus, den Befall durch Infektion mit einem Rassengemisch unter Freilandbedingungen zu erfassen. Vielmehr ist die Charakterisierung der Resistenz mit Hilfe verschiedener physiologischer Rassen notwendig. *Podosphaera leucotricha* ist in Bezug auf phänotypische Merkmale sehr gut beschrieben (KOTTE, 1958; BLUMER, 1967; SUTTON und JONES, 1979; BRAUN, 1995), über Virulenzunterschiede innerhalb der Erregerpopulation ist hingegen nur wenig bekannt. Ein Vorkommen physiologischer Rassen wird zwar allgemein vermutet (SCHANDER, 1958, ALSTON, 1969; COYIER, 1974, LESPINASSE et al., 1976; KORBAN und DAYTON, 1983; GOONEWARDENE et al., 1986), ist aber bislang noch nicht eindeutig nachgewiesen worden. KRIEGHOFF (1995) hat erstmals Ansätze zur Charakterisierung physiologischer Rassen erarbeitet. Eine eindeutige Klärung der Rassenfrage ist jedoch eine grundlegende Voraussetzung für die genaue Charakterisierung verschiedener Resistenzquellen.

Zur schnellen und einfachen Identifizierung von Resistenzgenen in Pflanzen haben sich molekulare Marker als wichtiges Hilfsmittel herausgestellt. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, schon sehr junge Sämlinge hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens einzustufen. Dies ist im Bezug auf Mehlttauresistenz besonders wichtig, da der Phänotyp "Mehlttauresistenz" beim Apfel erst nach mindestens drei Befallsjahren im Freiland sicher einschätzbar sein soll (MIHATSCH und MILDENBERGER, 1966a und 1967; JANSE et al., 1994). Genotypabhängig soll aber auch eine Frühselektionen nach dem ersten Standjahr zufrieden stellende Ergebnisse liefern (SCHANDER, 1958, KORBAN und DAYTON, 1983). Neben einer genotypisch bedingten "Altersresistenz" spielt aber auch der von Jahr zu Jahr witterungsabhängig unterschiedliche Infektionsdruck eine Rolle (LESPINASSE et al., 1976). Somit bedeutet die Verwendung molekularer Marker als Methode der Frühselektion in der Resistenzzüchtung eine große Zeit- und Platzersparnis. Anfällige Sämlinge können bereits im Aussaatbeet erkannt und eliminiert werden, die mehrjährige Weiterkultur dieser Pflanzen würde entfallen. Im Rahmen einer Akkumulation verschiedener Resistenzen in einem Genotyp sind eng gekoppelte molekulare Marker ein wichtiges Hilfsmittel zur Identifizierung der einzelnen Gene in der Pflanze (MICHELMORE, 1995; KNAPP, 1998; BUS et al., 2000; LUBY und SHAW, 2001).

Bisher hat sich die Entwicklung molekularer Marker beim Apfel weltweit hauptsächlich auf Resistenzen gegen den wirtschaftlich bedeutendsten pilzlichen Schaderreger am Apfel, den Apfelschorf konzentriert. Eng gekoppelte Marker liegen vor allem für das  $V_f$ -Gen vor (HEMMAT et al., 1998; KING et al., 1999; TARTARINI et al., 1999, XU und KORBAN, 2000), aber auch für  $V_m$  sind erste Marker identifiziert worden (CHENG et al., 1998). Die Isolierung des  $V_f$ -Gens ist beinahe abgeschlossen (VINATZER et al., 1998; PATOCCI et al., 1999a, 1999b). Erste molekulare Marker für Mehlttauresistenz sind zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur für  $Pl_1$  und  $Pl_2$  bekannt gewesen. SEGLIAS-HODEL (1997) hat in einer QTL-Analyse den RAPD-Marker OP N18 identifiziert, der 7 cM von  $Pl_2$  entfernt sein soll. N18 liegt als SCAR-Marker vor. Für die  $Pl_1$ -Resistenz haben MARKUSSEN et al. (1995) eine erste, auf RAPD-Markern basierende Karte erstellt. Der am engsten gekoppelte Marker, AT20-450, liegt ebenfalls als SCAR-Marker vor. Sein Abstand zu  $Pl_1$  wurde auf der Grundlage einer Kartierungspopulation aus 63 Einzelpflanzen mit 3 cM bestimmt. Molekulare Marker für zwei weite-

re Mehлтаuresistenzen,  $Pl_w$  und  $Pl_d$ , wurden inzwischen von PHILLIPS et al. (2000) identifiziert.

Einzelne Versuche zur markergestützten Selektion (MAS) mit den relevanten Markern für Schorf- und Mehлтаuresistenz sind durchgeführt worden (URBANIETZ et al., 1999; KELLERHALS et al., 2000, BUS et al., 2000). Während die Marker für Schorffresistenz weitgehend mit den phänotypischen Daten übereinstimmten, war das Ergebnis im Bezug auf den Mehltau bisher nicht zufrieden stellend.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Rahmen des Projekts D.A.R.E. (Durable Apple Resistance in Europe; URBANIETZ et al., 1999) die Grundlagen für eine effektive Züchtung dauerhaft mehлтаuresistenter Apfelsorten zu erweitern. Aus diesem Grund sind drei unterschiedliche Teilaspekte der Resistenz parallel bearbeitet worden.

Zum einen sollten vermutete neue Resistenzquellen gegenüber *Podosphaera leucotricha* für einen Einsatz in zukünftigen Resistenzzuchtprogrammen erschlossen werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die bereits von MARKUSSEN (1996) durchgeführte Kartierung des Mehлтаuresistenzgens  $Pl_1$  fortgeführt und präzisiert werden. Um molekulare Marker mit sehr enger Kopplung an das Zielgen zu identifizieren, sollte eine möglichst umfangreiche Kartierungspopulation erstellt und phänotypisch charakterisiert werden. Auf dieser Grundlage sollte eine Kartierung von  $Pl_1$  unter Anwendung der AFLP-Technik durchgeführt werden. Neu identifizierte Marker mit enger Kopplung an das Zielgen sollten für einen zukünftigen Einsatz in markergestützten Selektionsverfahren erschlossen werden.

Um Resistenzunterschiede zwischen *Malus* - Genotypen genauer einschätzen zu können, sollte als drittes die Frage der potentiellen Existenz physiologischer Rassen von *Podosphaera leucotricha* eindeutig geklärt werden. Dafür sollten Einsporisolate des Erregers erstellt und Methoden zur Charakterisierung der Isolate erarbeitet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Charakterisierung neuer Mehltaresistenzquellen

Mit dem Ziel, neue Resistenzquellen für die Züchtung zu erschließen, ist ein Testsortiment, bestehend aus 20 zumeist alten Kultursorten mit bekannt geringer Anfälligkeit für den Erreger, neun als resistent geltenden Wildarten, fünf schorffresistenten Sorten sowie zwei anfälligen Kontrollsorten in Zusammenarbeit mit europäischen Apfelzüchtern zusammengestellt worden. Einzelheiten zum Testsortiment sind in Kapitel 7.1. aufgeführt. Veredlungsreiser dieser Genotypen wurden am Institut für Zierpflanzenzüchtung (IZZ) der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Ahrensburg gesammelt, an vier weitere Standorte (Dresden-Pillnitz/Deutschland, Wädenswil/Schweiz, East Malling/Großbritannien und Angers/Frankreich) innerhalb Europas verschickt und dort in mehrfacher Wiederholung veredelt.

Im IZZ Ahrensburg wurden die Genotypen mit der "Chip-budding-Methode" auf die starkwüchsige Sämlingsunterlage 'Bittenfelder Sämling' veredelt. Die Veredlungen wurden im ersten Jahr (1998) im Abstand von 40 x 100 cm im Freiland aufgepflanzt. Im Jahr darauf wurden vier Wiederholungen im Abstand von 1,5 m in der Reihe und einem Reihenabstand von 2,5 m in die Obstanlage des Institutes für Zierpflanzenzüchtung in Ahrensburg verpflanzt. Während des Frühjahrs wurde abhängig vom Witterungsverlauf eine dreifache Blockspritzung mit geeigneten Fungiziden wie 'Kupferkalk', 'Discus', 'Scala', 'Delan' und 'Vision' zur Prävention von Schorf- und Krebsinfektion durchgeführt. Im Winter erfolgten kulturübliche Schnittmaßnahmen.

Zwei Wiederholungen des Testsortiments wurden im gleichen Jahr (1998) in einen Folientunnel mit offenen Seitenwänden im Abstand 40 x 40 cm in randomisierter Reihenfolge aufgepflanzt. Mit Hilfe von intensiven Schnittmaßnahmen erfolgte die Erziehung zur Wuchsform "schlanke Spindel". Die Kulturbedingungen werden in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben.

Eine visuelle Erfassung des Mehltaubefalls ist von 1999 bis 2001 mindestens einmal jährlich durchgeführt worden. Es wurde ausschließlich Sekundärbefall berücksichtigt. Die Einteilung in Befallsklassen erfolgte entsprechend des im Rahmen des Europäi-

schen Apfelgenom-Kartierungs-Projekts (KING, 1991) festgelegten Boniturklassen-Schemas 'Descriptor Code No. PL-F-2':

Boniturklasse 0: Kein Befall erkennbar

Boniturklasse 1: Sehr leichte Infektionen der Blätter

Boniturklasse 2: Leichte Infektion der Blätter, selten auch der Triebe

Boniturklasse 3: Mittelstarke Infektion an Blättern und/oder Trieben

Boniturklasse 4: Starke Infektion von Blättern und/oder Trieben

Boniturklasse 5: Sehr starke Blattinfektion, die meisten Triebe sind geschädigt

Im Folientunnel wurden die Pflanzen nach der Befallserfassung im Juni stark zurückgeschnitten und mit einem Mehлтаufungizid (80% Netzschwefel) behandelt. Bei günstigen Umweltbedingungen konnte dort im September eine zweite unabhängige Mehltau-Befallserfassung durchgeführt werden.

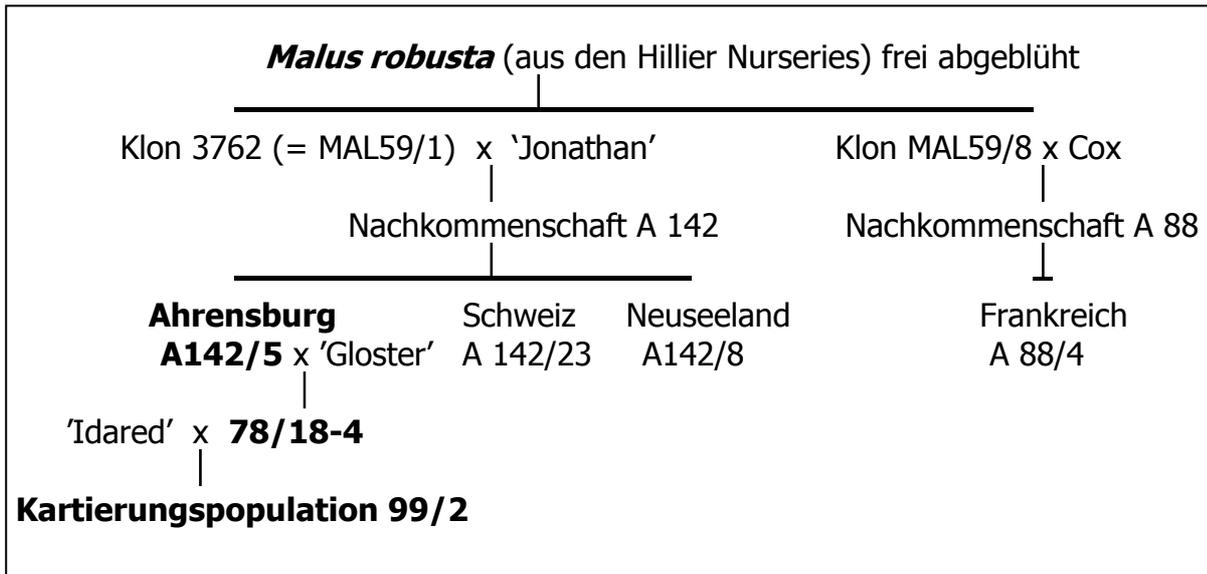
Auf der Basis der Boniturergebnisse aller drei Befallserfassungsjahre wurden die *Malus*-Genotypen des Testsortiments in drei Bewertungsstufen eingeteilt: Als resistent klassifizierte Genotypen sind befallsfrei geblieben, das heißt, sie waren in allen Befallserfassungen grundsätzlich in der Boniturklasse 0. Feldresistent eingestufte Genotypen wiesen gelegentlich geringen Befall der Boniturklasse 1 oder 2 auf. Als anfällig wurden solche Genotypen eingestuft, die mindestens einmal mit der Boniturklasse 3, 4 oder 5 bewertet worden waren. Eine Definition der einzelnen Boniturklassen ist in Kapitel 2.1. aufgeführt.

## **2.2. Kartierung des Resistenzgens $PI_1$**

### **2.2.1. Kartierungspopulation**

#### 2.2.1.1. Ausgangsmaterial

Die Kartierungspopulation 99/2 entstammt einer Kreuzung der anfälligen Kultursorte 'Idared' als weiblichem Elter mit einem am Institut für Zierpflanzenzüchtung in Ahrensburg gezüchteten mehltaresistenten Klon, 78/18-4, als Vater. Die Mehltaresistenz von 78/18-4 geht zurück auf die von KNIGHT und ALSTON (1968) als Träger der  $PI_1$ -Resistenz definierten Klone MAL 59/1 und MAL 59/2 (Abb. 2.1.).



**Abb.: 2.1.:** Herkunft der Kartierungspopulation 99/2

#### 2.2.1.2. Erstellung der Kartierungspopulation

Vor Blühbeginn sind etwa 50 mit Blüten besetzte Triebe der Muttersorte 'Idared' mit einem Vliesbeutel umschlossen worden. Die Blüten in diesem Bereich sind im Ballonstadium kastriert worden. Blüten des männlichen Elters wurden im Ballonstadium geerntet, im Labor in feuchtem Sand gesteckt und zum Aufblühen gebracht. Sobald die Antheren den Pollen freizusetzen begannen, wurden sie in Blutzuckerröhrchen gesammelt und anschließend mit Hilfe von trockenem Silica-Gel (Roth, Karlsruhe) im Exikator getrocknet. Der Pollen konnte in diesem Zustand mehrere Tage bei +4°C gelagert werden. Um eine möglichst sichere Befruchtung zu gewährleisten, sind während der gesamten Blütezeit von acht Tagen die Narben täglich mit Pollen bestäubt worden. Nachdem alle Apfelbäume in der Obstanlage abgeblüht waren, wurden die Vliesbeutel entfernt. Die Äpfel wurden im September geerntet und die Samen nach Aufschneiden der Frucht aus dem Fruchtfleisch herausgelöst. Sie wurden einen Tag auf Papier ausgebreitet getrocknet und bei +4°C bis zum Beginn der Stratifikationsphase im Dezember gelagert. Zum Stratifizieren wurde das Saatgut bei Raumtemperatur für drei Minuten in eine dreiprozentige Natriumhypochlorid-Lösung getaucht, drei mal mit autoklaviertem Leitungswasser gespült und anschließend auf feuchtem Filterpapier in verschlossenen Petrischalen bei +4°C im Kühlraum gelagert. Sobald etwa Anfang März die ersten Keimwurzeln sichtbar waren, wurden die Samen in Aussaatkisten im Abstand von 5 x 5 cm 1 cm tief in eine Torf-Sand-Mischung (1:1)

gesät und im Gewächshaus bei +18°C kultiviert. Rund acht Wochen später, als sich etwa vier Laubblätter entwickelt hatten, erfolgte die Verpflanzung in einen Folientunnel.

#### 2.2.1.3. Kultur der Kartierungspopulation

Die Sämlinge sind in einem Folientunnel mit offenen Seitenwänden im Abstand von 40 cm direkt in die Erde gepflanzt worden. Sie wurden täglich am Morgen mit Hilfe von auf dem Boden ausgelegten Sprühschläuchen von unten bewässert. Mit dieser Bewässerungsmethode wurden gleichzeitig die Blätter mit Wasser benetzt. Im Frühjahr ist jeweils eine stickstoffbetonte Depotdüngung mit 30g/m<sup>2</sup> Nitrophoska Perfekt und 20g/m<sup>2</sup> Patentkali durchgeführt worden. Im Jahr 2000 wurde wegen auftretender Mangelerscheinungen in Form von Blattvergilbung und Kümmerwuchs eine zusätzliche Applikation eines Mikronährstoff-Düngers ('Flory 10', 0,25 g/l ) durchgeführt. Aufgrund eines starken Befalls mit Schadinsekten mussten während der Vegetationsperiode mehrfach nach Bedarf Insektizidbehandlungen (Unden, Roxion, Neudosan oder Vertimec) durchgeführt werden.

#### 2.2.1.4. Erfassung des Mehltaubefalls

Die Befallserfassung in den Jahren 1999 bis 2001 wurden von der selben Person durch Bonitur des natürlich auftretenden Befalls durchgeführt. Es wurde ausschließlich Sekundärbefall berücksichtigt. Die Einteilung in Befallsklassen erfolgte entsprechend des im Rahmen des Europäischen Apfelgenom-Kartierungs-Projekts (KING, 1991) festgelegten Boniturschemas 'Descriptor Code No. PL-F-2' (vergl. Kapitel 2.1.) Im Aussaatjahr der Kartierungspopulation 1999 konnten erstmals im September Infektionsunterschiede erfasst werden. In den beiden Folgejahren (2000 und 2001) wurde jeweils im Juni eine Bonitur durchgeführt. Anschließend erfolgte ein starker Rückschnitt und eine Spritzung mit 80% Netzschwefel. Eine zweite unabhängige Befallserfassung wurde jeweils für Ende September angestrebt, konnte aber wegen der bereits in Kapitel 2.2.1.3. beschriebenen Mikronährstoffmangel-Symptome im Jahr 2000 sowie starkem Schadinsektenbefall im Bereich des Neuaustriebs während des Jahrs 2001 nicht durchgeführt werden.

## 2.2.2. Molekulare Analysen

### 2.2.2.1. DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte mit einigen Modifikationen nach dem 'CTAB-Protokoll' (DOYLE und DOYLE, 1987).

Möglichst junge, noch nicht ausgewachsene Blätter wurden in 2ml -Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) in flüssigem Stickstoff gefrostet und mit Hilfe von zwei Edelstahl-Mahlkugeln in einer Schwingmühle (Retsch, Haan) für 5 Minuten bei 80% Leistung fein zerstoßen. Anschließend ist 1 ml erwärmter CTAB-Extraktionspuffer (Kapitel 7.2.) und 30 µl RNase A-Lösung (100 mg/ml; Roche, Mannheim) hinzugefügt und die Suspension bei 65°C im Wasserbad für 30 Minuten inkubiert worden. Der Extrakt wurde mit Hilfe einer Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion und einer anschließenden Phenol/Chloroform-Behandlung weiter aufgereinigt. Zum Schluss wurde die DNA mit Ethanol gefällt und in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. Eine Überprüfung der Qualität der DNA anhand des Grads ihrer Scherung erfolgte durch Elektrophorese auf einem 1%igen Agarose-Gel, versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, in 1x TAE-Puffer. Zur Quantifizierung mit dem 'Tropfentest' wurde 1 µl der DNA-Suspension zusammen mit 8 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) auf Parafilm aufgetragen und anhand mit einer Eichreihe aus λ-DNA bekannter Konzentration unter UV-Licht aufgrund von Farbintensitätsunterschieden am Geldokumentations-PC (Software: Quantity One 4.2.1; Bio-Rad, München) bestimmt.

### 2.2.2.2. Molekulare Verifikation der Resistenz

Die molekulare Verifikation der visuellen Resistenzerfassung erfolgte mit dem SCAR-Marker AT20-450 (MARKUSSEN, 1996). SCAR steht für Sequence Characterized Amplified Region und ist ein sequenzspezifischer Marker, der mit Hilfe von zwei Primern, einem "Forward"- und einem "Reverse"-Primer, in einer PCR-Reaktion erhalten wird.

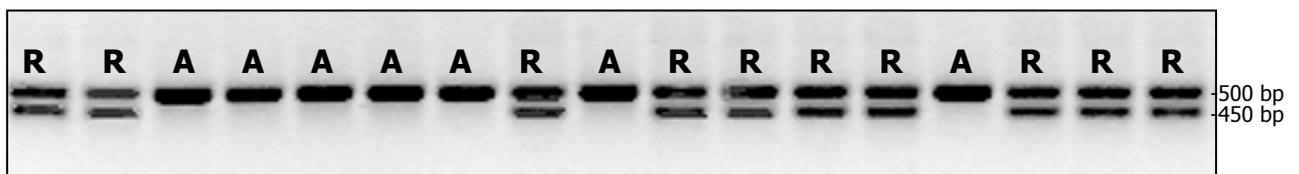
In der PCR-Reaktion wurden 25 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl in 1x Williams-Puffer (Kapitel 7.2.) zusammen mit 100 µMol dNTP's, 0,4 µMol eines jeden Primers (AT20-Forward und AT20-Reverse) und 1 unit Taq-Polymerase (Invitrogen, Eggenstein) eingesetzt. Die Proben wurden in 96-well-Mikrotiterplatten (Corning; Fi-

sher Scientific, Schwerte) mit Mineralöl (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) überschichtet in einem Thermocycler (Hybaid, Heidelberg oder MWG, Ebersberg) unter folgenden Reaktionsbedingungen amplifiziert:

1 Zyklus	:	5,0 Minuten	94°C	Denaturieren
		1,0 Minuten	58°C	Annealing
		2,0 Minuten	72°C	Polymerisation
38 Zyklen	:	0,5 Minuten	94°C	Denaturieren
		1,0 Minuten	58°C	Annealing
		2,0 Minuten	72°C	Polymerisation
1 Zyklus	:	0,5 Minuten	94°C	Denaturieren
		1,0 Minuten	58°C	Annealing
		5,0 Minuten	72°C	Polymerisation

Die Auftrennung der in der PCR-Reaktion amplifizierten Produkte erfolgte auf 1,5 %igen Agarosegelen, versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, in 1x TAE-Puffer. Nach zwei Stunden Laufzeit bei 120V wurden die Bandenmuster auf einem UV-Transilluminator mit einer Digitalkamera dokumentiert.

Das Bandenmuster besteht aus zwei Banden im Bereich von 450 und 500 Basenpaaren. Das Vorhandensein der Bande im Bereich von 450 bp ist ein molekularer Marker für  $Pl_1$ -Resistenz. Die Bande im Bereich von 500 bp ist grundsätzlich vorhanden. Ein Beispiel für ein Bandenmuster von AT20-450 ist in Abbildung 2.2. dargestellt.



**Abb. 2.2:** Bandenmuster des SCAR-Markers AT20-450 in einem Ausschnitt der Kartierungs-populatio99/2. R= resistenter Genotyp, A= anfälliger Genotyp

Nur Genotypen, bei denen neben eindeutigen Befallsdaten die Präsenz bzw. Abwesenheit von  $Pl_1$  auch durch Amplifikation mit dem SCAR-Marker AT20-450 bestätigt worden war, wurden für die anschließende 'Bulked-Segregant-Analyse' verwendet.

### 2.2.2.3. AFLP-gestützte "Bulked-Segregant-Analyse"

Für die Identifizierung weiterer molekularer Marker für  $Pl_1$  ist eine "Bulked-Segregant-Analyse" nach MICHELMORE et. al. (1990) unter Verwendung der AFLP-Technik durchgeführt worden. Zur Erstellung von Bulks sind 20 visuell als resistent und 20 visuell als anfällige bonitierte Genotypen aus der Kartierungspopulation 99/2 (vergl. Abb. 2.1.) ausgewählt worden. Ihre Eignung war molekular mit dem SCAR-Marker AT20-450 verifiziert worden (vergl. Kapitel 2.2.3.2.).

Die AFLP-Reaktion erfolgte mit Modifikationen nach VOS et. al. (1995). 300 ng genomischer DNA wurden in 1x RL-Puffer (Kapitel 7.2.) in einem Gesamtvolumen von 30  $\mu$ l mit je 3 units *Eco* RI (Invitrogen, Eggersheim) und *Mse*I (Biolabs, Schwalbach) für mindestens 3 Stunden bei +37°C verdaut. Die Restriktion konnte durch den Auftrag von 5  $\mu$ l des Ansatzes auf ein 1%iges Agarosegel überprüft werden. Für die anschließende Ligation der Adapter wurden 5  $\mu$ l eines Mastermixes, bestehend aus 5 pMol *Eco* RI-Adapter, 50 pMol *Mse* I-Adapter (Synthese: MWG Biotech, Ebersberg), 0,25 units T4 DNA-Ligase (Invitrogen, Eggersheim) und 1 mM ATP in RL-Puffer, hinzugefügt. Die Adaptersequenzen waren wie folgt:

*Mse*I (oben) : 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'

*Mse*I (unten) : 5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'

*Eco*RI (oben) : 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'

*Eco*RI (unten) : 5' AAT TGG TAC GCA GTC-3'

Die Ligation erfolgte bei +37°C für 3,5 Stunden oder alternativ bei Raumtemperatur über Nacht.

Im ersten Amplifikationsschritt, der Präamplifikation, sind Primer eingesetzt worden, welche sich aus der Sequenz der Adapter, der Schnittsequenz des jeweiligen Enzyms und einer zusätzlichen selektiven Base zusammensetzen. Dafür wurden 5  $\mu$ l des Ligationansatzes in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l 1x Williams-Puffer (Kapitel 7.2.) mit 0,2 mM dNTPs, je 75 ng des *Mse*+1-Primers und des *Eco*+1-Primer sowie 5 units Taq-Polymerase amplifiziert. Die Sequenz der eingesetzten Primer war wie folgt:

*Eco*+C: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CC-3'

*Eco*+A: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'

*Mse*+C: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'

Die PCR wurde in 96-well-Mikrotiterplatten (Corning BV 6511; Fisher Scientific, Schwerte), mit Mineralöl überschichtet in einem Primus 96 Thermocycler (MWG Biotech, Ebersberg) ausgeführt. Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt:

20 Zyklen	0,5 Minuten	94°C	Denaturieren
	1,0 Minuten	56°C	Annealing
	2,0 Minuten	72°C	Polymerisation

Das Gelingen der Amplifikation konnte durch den Auftrag von 15 µl des Ansatzes auf ein 1%iges Agarosegel, versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, überprüft werden.. Das Präamplifikationsprodukt ist anschließend im Verhältnis 1:20 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt worden. In der Endreaktion erfolgte die selektive Amplifikation der verdünnten Präamplifikationsprodukte aus einer Reaktion mit den Primern Mse+C / Eco+A und einer weiteren Reaktion mit den Primern Mse+C / Eco+C gemeinsam in einem Multiplex-Verfahren, wie bei MYBURG et al. (2001) beschrieben. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

10 Zyklen:	1,0 Minuten	94°C	Denaturieren
	1,0 Minuten	65-56°C	Annealing
			[Zyklus 1: 65°C; pro Zyklus 1°C abgesenkt]
	1,0 Minuten	72°C	Polymerisation
23 Zyklen:	0,5 Minuten	94°C	Denaturieren
	0,5 Minuten	56°C	Annealing
	1,0 Minuten	72°C	Polymerisation.

Die PCR erfolgte in 96-well-Mikrotiterplatten in einem Primus 96 Thermocycler. Die verwendeten Primer entsprechen in der Sequenz den Präamplifikationsprimern, sind aber um zwei weitere selektive Basen verlängert. Im Gegensatz zu VOS et al. (1995) sind diese nicht radioaktiv markiert worden; stattdessen ist eine Markierung der *Eco*RI-Primer mit Hilfe von angelagerten Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt (MYBURG et al., 2001), die im Infrarot-Bereich bei 700 und 800 nm detektiert werden (Li-COR Biosciences, Bad Homburg). Alle Eco+Axx –Primer waren IRD-800-markiert, während alle Eco+Cxx –Primer IRD-700-markiert vorlagen (Synthese: MWG Biotech, Ebersberg).

Die verdünnten Präamplifikationsprodukte von einem *Mse* I-Primer mit zwei unterschiedlichen *Eco* RI-Primern konnten deshalb in einer gemeinsamen Endreaktion eingesetzt werden.

In der Endreaktion wurden je Probe 2,5 µl des verdünnten und gemischten Präamplifikationsprodukts in einem Gesamtvolumen von 10 µl 1x Williams-Puffer zusammen mit 0,2 mM dNTPs, 0,25 units Taq-Polymerase, 15 ng *Mse*+*Cxx* -Primer, 2,5 ng *Eco*+*Axx*-Primer (IRD 800) und 2,5 ng *Eco*+*Cxx*-Primer (IRD 700) eingesetzt und mit Mineralöl überschichtet.

Nach der PCR-Reaktion wurde den Proben ein Volumen AFLP-Dye (Kapitel 7.2.) hinzugefügt und diese dann mindestens vier Stunden bei -20°C eingefroren. Die Proben wurden anschließend bei 72°C für drei Minuten denaturiert, auf einem denaturierenden 6%igen Polyacrylamidgel (Kapitel 7.2.) in 1x TBE-Puffer (Kapitel 7.2.) aufgetragen und mit einem automatischen Sequencer vom Typ 'DNA Analyzer Gene ReadIR 4200 Dual Dye' (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) analysiert.

Für die Erstellung der Bulks für die 'Bulked-Segregant Analyse' wurde das verdünnte Präamplifikationsprodukt von jeweils 10 resistenten oder anfälligen Genotypen gemischt. Da 20 resistente und 20 anfällige Genotypen für die Erstellung der Bulks ausgewählt worden waren, entstanden so zwei Bulks aus anfälligen und zwei Bulks aus resistenten Pflanzen. Die Bulks aus resistenten Pflanzen wurden mit Bulk1 und Bulk2, die Bulks aus anfälligen Pflanzen mit Bulk3 und Bulk4 bezeichnet.

Zur Identifikation weiterer Marker im Intervall zwischen den beiden am engsten gekoppelten Markern AFLP1 und AFLP2 (vergl. Abb. 3.2.) und  $Pl_1$  ist eine "Narrow-Down-Bulked-Segregant-Analyse", modifiziert nach XU und KORBAN (2000), mit einem zusätzlichen Satz an AFLP-Primerkombinationen durchgeführt worden. Dafür sind neue Bulks aus resistenten Genotypen der Kartierungspopulation gebildet worden, die nur mit den am engsten gekoppelten Markern als resistent identifiziert werden konnten. Pflanzen aus Bulk5 konnten nur mit den neu identifizierten Markern AFLP1 und AFLP2 als resistent identifiziert werden. Bei Pflanzen aus Bulk6 war dies auch mit dem SCAR-Marker AT20-450 möglich, nicht aber mit allen weiteren in Abbildung 3.2. aufgeführten Markern. Als Bulks von anfälligen Pflanzen wurden erneut Bulk3 und Bulk 4 verwendet.

Die Präamplifikation ist mit *Eco* RI- und *Mse* I-Primern ohne selektive Base durchgeführt worden. Die Basensequenz der Primer war wie folgt:

Eco+0: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'

Mse+0: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'

Für die Endreaktion ist bei den *Mse* I-Primern als erste selektive Base 'T' verwendet worden. Die Sequenz des Primers war deshalb wie folgt:

Mse+T: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA ATxx-3'

Die *Eco* RI-Primer waren die gleichen wie in der 'Bulked-Segregant-Analyse' mit den Bulks 1, 2, 3 und 4.

#### 2.2.2.4. Erstellen einer Kopplungskarte für $Pl_1$

Zur Erstellung einer  $Pl_1$ -Markerkarte ist die Kartierungssoftware JoinMap 3.0. (Van OOIJEN und VOORRIPS, 2001) verwendet worden. Die Umwandlung der 0/1-Datenmatrix in die vom Programm JoinMap 3.0 benötigten Genotypen-Codes erfolgte mit Hilfe des Programms MS Excel. Die Zuordnung der Marker zu einer gemeinsamen Kopplungsgruppe wurde mit Hilfe der Kosambi-Kartierungsfunktion bei LOD-Grenzwerten von 2.0 und 3.0 durchgeführt. Mit dem Programm JoinMap 3.0 konnte auch die anschließende graphische Darstellung der  $Pl_1$ -Kopplungsgruppe durchgeführt werden.

#### 2.2.2.5. Umwandlung von AFLP-Markern in SCAR-Marker

##### 2.2.2.5.1. Klonieren von AFLP-Fragmenten

Zum Klonieren der als Marker identifizierten AFLP-Fragmente AFLP1 und AFLP2 mussten diese zunächst aus dem Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten werden. Dafür wurden für jeden Marker zehn PCR-Reaktionen des resistenten Elters auf ein 0,4 mm starkes 6%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und der Gellauf beim Erscheinen der erwarteten Bande auf dem Computerbildschirm angehalten. Im Detektionsbereich des Lasers wurden mehrere Fraktionen aus dem Gel ausgeschnitten und jede Fraktion in ein separates 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500µl  $H_2O_{bidest}$  überführt. Nach 10

Minuten wurde der Überstand verworfen, durch 200 µl frischem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ersetzt und der Ansatz zunächst für 20 Minuten bei +65°C und anschließend für 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gelreste wurden durch Zentrifugation von der flüssigen Phase getrennt, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 0,5 µl davon in einer AFLP-Reaktion mit der zum ursprünglichen AFLP-Marker zugehörigen Primerkombination eingesetzt. Durch Vergleich mit den originalen AFLP-Mustern konnte jeweils diejenige Fraktion ermittelt werden, die das Markerfragment enthielt. Die PCR-Reaktion mit DNA aus dieser Fraktion erfolgte für jeden der beiden Marker 12-fach wiederholt. Im Anschluss wurden die Amplifikationsprodukte jedes Markers in einer Probe vereint, durch Chloroform-Extraktion aufgereinigt und mit 2 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 5 M Lithiumchlorid gefällt. Die DNA wurde in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert und die Konzentration mit dem in Kapitel 2.2.2.1. beschriebenen Tropfentest ermittelt.

10 ng eines jeden Fragments sind nach Herstellerangaben in den Vektor pGEM-T-Easy (Promega, Madison/Wisc., USA) ligiert worden. 1 µl dieses Ligationsansatzes wurde anschließend durch Elektroporation mit einem *E.coli* -Pulser (BioRad, München) ( 12 kV/cm, 2000 Ω, 25 µF) in hochkompetente *E. coli* - Zellen vom Stamm DH10B transformiert. Nach einer Erholungsphase von 45 Minuten bei +37°C in SOC-Medium (Kapitel 7.2.) konnte die Bakteriensuspensionen zu je 150 µl pro Petrischale auf festes LB-Medium (Kapitel 7.2.) mit 100 mg/l Ampicillin sowie 16 g/l IPTG und 32 g/l xGal ausplattiert werden. Die Inkubation der Platten erfolgte für 12 Stunden bei +37°C. Nach weiteren 24 Stunden im Kühlschrank bei +4°C konnten rekombinante Kolonien durch Blau-Weiß-Selektion ermittelt werden. Sie wurden in flüssiges LB-Medium überführt und die Größe der Inserts durch Amplifikation mit M13-Primern überprüft. Die Primersequenz war wie folgt:

M13 Forward : 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'

M13 Reverse : 5'-CAG CAA ACA GCT ATG ACC-3'

Klone der erwarteten Fragmentgröße wurden dann gemeinsam mit der DNA der Eltern der Kartierungspopulation in einer AFLP-Reaktion mit der jeweiligen Marker- Primerkombination eingesetzt. Der Größenvergleich mit den ursprünglichen AFLP-Fragmenten auf einem Polyacrylamid-Gel ergab jene Klone, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ein erwünschtes Insert enthalten.

Die selektierten Klone wurden zur Herstellung von Dauerkulturen in Freezing Broth (Kapitel 7.2.) überführt, über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert.

#### 2.2.2.5.2. Sequenzanalyse von AFLP-Fragmenten

##### 2.2.2.5.2.1. Plasmid-Präparation

Um die Plasmide aus Klonen zu isolieren, sind jeweils 5 ml LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin mit den selektierten Klonen angeimpft und über Nacht auf dem Schüttler (175 rpm) bei 37°C inkubiert worden. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand verworfen. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden: zum einen mit einer alkalische Lyse nach SAMBROOK und RUSSELL (2001) und zum anderen mit Hilfe des Qiaprep-Spin Miniprep Kits (Qiagen GmbH, Hilden). Das Qiaprep-Spin Miniprep Kit ist nach Bedienungsanleitung des Herstellers durchgeführt worden. Für die Alkalische Lyse wurde das Bakterienpellet in 200 µl Solution I [50 mM Glucose, 25 mM Tris (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)] resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 400 µl Solution II (0,2 N NaOH, 1% SDS). Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur musste 300 µl Solution III (3M Kaliumacetat) hinzugefügt und für 25 Minuten auf Eis inkubiert werden. Die Suspension wurden anschließend zentrifugiert, die flüssige Phase mit Phenol/Chloroform aufgereinigt und mit Isopropanol gefällt. Die Resuspension der DNA erfolgte in 100 µl TE-Puffer (Kapitel 7.2.). Nach RNase-Behandlung und Aufreinigung mit Chloroform wurde die DNA mit 2 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 5 M NaCl gefällt, getrocknet, in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert und mit dem in Kapitel 2.2.2.1. beschriebenen Tropfentest quantifiziert.

##### 2.2.2.5.2.2. Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte in 96-well-Mikrotiterplatten mit dem "Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit" (Amersham Pharmacia, Freiburg). Je 7,5 ng Primer M13 forward (IRD 700) und M13 reverse (IRD 800) wurden zusammen mit 500 ng Plasmid-DNA und 2 µl DMSO in einem Gesamtvolumen von 14 µl vorbereitet. Zu jeweils

3 µl dieses Ansatzes wurde 1 µl Nukleotidlösung (A, C, G oder T) hinzugefügt, mit Mineralöl überschichtet, und in einem Primus 96 plus Thermocycler unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

1 Zyklus	2,0 Minuten	95°C	Denaturieren
	0,5 Minuten	54°C	Annealing
	0,5 Minuten	72°C	Polymerisation
25 Zyklen	0,3 Minuten	95°C	Denaturieren
	0,5 Minuten	54°C	Annealing
	0,5 Minuten	72°C	Polymerisation

Die Amplifikationsprodukte wurden 3 Minuten bei 72°C denaturiert und auf einem 41 cm langen, 8%igen denaturierenden Polyacrylamidgel in 1x TBE-Puffer in einem Sequencer vom Typ "DNA-Analyzer Gene ReadIR 4200 Dual Dye" analysiert und die Sequenzinformation mit der zugehörigen Software aufbereitet (LI-COR Biosciences, Bad Homburg). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software "DNAsis for Windows 2.1" (Hitachi Software, San Bruno /Ca., USA).

Auf Basis der so erhaltenen Sequenzen der AFLP-Klone sind mit Hilfe des Programms 'Oligo Primer Analysis Software, Version 5.0 for Windows' (National Bioscience Inc., Plymouth, UK) PCR-Primerpaare aus den sequenzierten Klonfragmenten abgeleitet worden. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, synthetisiert.

#### 2.2.2.6. SCAR-Marker

Der Einsatz von SCAR-Markern (Sequence Characterized Amplified Region, PARAN und MICHELMORE, 1993) ermöglichte eine schnelle und einfach durchführbare Testung großer Nachkommenschaften.

Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches und die Reaktionsbedingungen entsprachen dem in Kapitel 2.2.2.2. beschriebenen Ansatz. Die für die Primer optimale Annealingtemperatur wurde für jeden Primer durch Gradienten-PCR in einem Mastercycler 'Gradient' (Eppendorf, Hamburg) im Bereich von 10°C um die theoretische Annealingtemperatur bestimmt.

Die Auftrennung der in der PCR-Reaktion amplifizierten Produkte erfolgte auf einem 2 %igen Agarosegel, versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, in 1x TAE-Puffer. Nach

einer Stunden Laufzeit bei 120 V wurden die Bandenmuster auf einem UV-Transilluminator mit Hilfe einer Digitalkamera dokumentiert.

Alternativ wurde eine Auftrennung mit Hilfe der SSCP-Technik (single-strand conformational polymorphism, ORITA et al., 1989) durchgeführt. Nach SLABAUGH et. al. (1997) wurden 5 µl des Amplifikationsprodukts mit der gleichen Menge SSCP-Dye (Kapitel 7.2.) gemischt und 5 µl davon auf ein 1x MDE-Gel (Kapitel 7.2.) in 0,6x TBE-Puffer aufgetragen und im Kühlraum bei +4°C in 14 Stunden bei 300V, 20 mA und 2 W aufgetrennt. Anschließend wurde wie folgt eine Silberfärbung durchgeführt: Die Fragmente wurden mit einem 30-minütigen Bad in 7,5 %iger Essigsäure auf dem Gel fixiert, für 45 Minuten in einer Lösung aus 0,1% Silbernitrat und 1,5 ml/l Formaldehyd (37%) gefärbt und die Färbung durch Schwenken des Gels in gekühlter Entwicklungslösung [3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,5 ml/l Formaldehyd (37%), 8 µl einer frisch angesetzten Natriumthiosulfat-Lösung (0,2 g/ml)] bis zur optimalen Farbintensität sichtbar gemacht. Das Hinzufügen von 7,5 %iger Essigsäure unterbrach die Entwicklungsreaktion. Anschließend wurde das Gel getrocknet und auf einer Leuchtplatte (Biotec-Fischer, Reiskirchen) mit einer Digitalkamera fotografiert.

#### 2.2.2.7. CAPS-Marker

Bei einer Durchführung der Markeranalyse mit Hilfe von CAPS-Markern (Cleaved Amplified Polymorphic Region) wird das PCR-Amplifikat von SCAR-Primern mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut.

Die PCR-Reaktion des verwendeten SCAR-Primers erfolgte entsprechend der in Kapitel 2.2.3.6. angegebenen Reaktionsbedingungen. Im Anschluss sind zu jeder Probe 2 units Enzym und 3 µl 10x Puffer "React 2" (beides New England Biolabs, Frankfurt/Main) hinzugefügt und durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> das Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes auf 30 µl eingestellt worden. Nach einer Inkubationszeit von mindestens drei Stunden bei 37°C wurden die Proben auf ein 2 %iges Agarosegel, versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, in 1x TAE-Puffer aufgetragen und nach einer Laufzeit von einer Stunde bei 120 V auf einem UV-Transilluminator mit einer Digitalkamera dokumentiert.

## **2.3. Charakterisierung von *Podosphaera leucotricha***

### **2.3.1. *in vitro* – Kultur von *Malus*-Wirtspflanzen**

Als Wirtspflanze zur Kultur von *Podosphaera leucotricha* sind die vier Apfelgenotypen 'Elstar', 'Gibb's Golden Gage', 'Golden Delicious' und 'McIntosh' als *in vitro* – Pflanzen vom Institut für Obstzüchtung in Dresden-Pillnitz zur Verfügung gestellt worden.

Zusätzlich wurden sechs weitere Genotypen (*Malus hupehensis*, *Malus zumi calocarpa*, *Malus baccata mandshurica*, 78/18-4, A143/24 und 'Durello di Forli') in Sterilkultur aufgenommen. Dafür wurden junge, noch nicht verholzte Langtriebe entblättert und in Abschnitte geteilt, so dass jedes Stück eine Blattachselknospe aufwies. Die Oberflächensterilisation erfolgte in einer 3%igen Natriumhypochlorid-Lösung, versetzt mit einigen Tropfen Tween (0,1%) für 20 Minuten auf einem Magnetrührer. Anschließend ist drei mal zehn Minuten mit sterilem Leitungswasser gespült worden. Die Sprossabschnitte wurden mit einem Skalpell 2-4 mm ober- und unterhalb der Blattachselknospe frisch abgeschnitten und auf das Nährmedium 'M7' (Kapitel 7.3.; Hormone nach SRISKANDARAJAH et al., 1990) in Glaspetrischalen gesetzt. Die Schalen wurden mit Parafilm verschlossen im Kulturraum bei 24°C und 16 Stunden Licht (3000-4000 Lux) kultiviert (Philips"TL"D Warmtonleuchtstoffröhren, Firma Kluxen, Hamburg). Wegen einer starken Ausscheidung phenolischer Substanzen mussten alle Sprossabschnitte nach 24 Stunden auf frisches Medium umgesetzt werden. Mit Mikroorganismen kontaminierte Schalen wurden in den folgenden Wochen eliminiert. Der junge Austrieb konnte nach etwa sechs Wochen auf das Vermehrungsmedium 'M2' (Kapitel 7.3.) übertragen werden.

Die Kultur und Vermehrung der etablierten Genotypen erfolgte in 250 ml Weckgläsern (Weck, Wehr-Öfingen) mit Nährmedium 'M2' (Kapitel 7.2.) im 16-Stunden-Tag bei 24°C und 3000 bis 4000 Lux Auflicht. Alle sechs bis acht Wochen wurden Subkulturen angelegt.

### **2.3.2. Kultur von *Podosphaera leucotricha***

Für die Kultur von Einsporisolen sind Mehltauherkünfte aus Ahrensburg, Dresden-Pillnitz, Angers (Frankreich), East Malling (Großbritannien), Naoussa (Griechenland) und Bologna (Italien) verwendet worden.

### 2.3.2.1. Erstellen von Einsporisolaten

Zur Überführung von *Podosphaera leucotricha* in Sterilkultur wurden Konidien unter einer Sterilwerkbank von infiziertem Apfel-Blattmaterial auf Einzelblätter von *in vitro*-Sprossen der hochanfälligen Sorte 'Gibb's Golden Gage' übertragen. Das Inokulum stammte entweder von potentiell infizierten Apfeltrieben, welche im Spätwinter in geschlossenen Erlenmeyerkolben angetrieben worden waren oder aber im Sommer von Blättern mit Sekundärbefall. In beiden Fällen wurden Konidien mit einer 0,2 mm dünnen Impfnadel unter einem Binokular (Leitz, Wetzlar) bei 40-facher Vergrößerung auf die Blattspitze von *in vitro* – Blättern übertragen. Die Blätter sind auf Sorbitol-Agar [30g Sorbitol, 7% Agar (Difco Bitek Agar; Otto Nordwald, Hamburg)] in mit Parafilm verschlossenen kleinen Glaspetrischalen mit 6 cm Durchmesser im 16-Stunden-Tag (3000-4000 Lux Auflicht) bei +22°C für 10-14 Tage kultiviert worden. Mit Mikroorganismen kontaminierte Schalen mussten eliminiert werden.

Für die Erstellung der Einsporisolate sind in einem zweiten Arbeitsschritt Konidien eines einzelnen Konidienträgers auf frische Einzelblätter von *in vitro* kultivierten Sprossen übertragen worden. Nach mindestens vierfacher Subkultur mit Konidien eines einzelnen Konidienträgers wurde die sich entwickelnde Pilzkolonie als Einsporisolat betrachtet.

### 2.3.2.2. Kultur von Einsporisolaten

Um Wirtsmaterial für eine Dualkultur mit dem Erreger zu erstellen, wurden nach vier Wochen jeweils drei ganze Sproßbüschel der Sorte 'Gibb's Golden Gage' auf das hormonfreie Nährmedium 'M2-00' (Kapitel 7.3.) in 250 ml-Weckgläser übertragen. Nach drei bis fünf Tagen Kultur bei mindestens 4000 Lux Auflicht im 16-Stunden-Tag bei +24°C konnten die Sprosse mit den Einsporisolaten inokuliert werden.

Im Anschluss an die Isolaterstellung erfolgte die Langzeitkultur auf *in vitro*-Sproßbüscheln von 'Gibb's Golden Gage'. Dazu wurde das Einzelblatt mit dem Einsporisolat mehrfach über das zu inokulierende Sproßbüschel gestrichen. Nach etwa zwei Wochen unter den eben beschriebenen Kulturbedingungen konnte der Erfolg der Übertragung bewertet werden.

Für den Erhalt der Einsporisolate wurden drei *in vitro*-Sproßbüschel pro 250 ml-Weckglas durch Überstreichen mit mindestens drei stark infizierten Blättern inokuliert. Der optimale Zeitrahmen zum Erstellen von Subkulturen war 14 bis 20 Tage nach der Inokulation. Für jedes Isolat wurden mindestens zwei parallele Subkulturen angelegt.

Zur Vermehrung von einzelnen Isolaten erfolgte nach Bedarf die parallele Inokulation von Sproßbüscheln in vier bis acht Weckgläsern.

### **2.3.3. Molekulare Charakterisierung**

#### 2.3.3.1. DNA-Isolierung

##### 2.3.3.1.1. PEX-Protokoll

Zur DNA-Isolierung nach dem 'PEX-Protokoll', modifiziert nach JHINGAN (1992) und ROSS (1995), wurde DNA ohne mechanischen Zellaufschluß mit Hilfe von Kaliumxanthogenaten isoliert. Stark infiziertes Pflanzenmaterial ist gesammelt und in 1 ml PEX-Extraktionspuffer (Kapitel 7.2.) in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen für mindestens 24 Stunden bei -20°C eingefroren worden. Für die Extraktion wurden die Proben in gefrorenem Zustand in ein 80°C warmes Wasserbad gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Zwischendurch sollten die Proben 2-3 mal mit einem Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia/NY, USA) geschüttelt werden. Die Proben wurden anschließend auf Eis gekühlt und durch Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Nach RNAse-Behandlung (Zugabe von 3 µl RNase [100 mg/ml]; Inkubation 1 Stunde bei 37°C) wurde die DNA mit 2 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M) gefällt, getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem in Kapitel 2.2.3.1. beschriebenen Tropfentest.

##### 2.3.3.1.2. CTAB-Protokoll

Zur DNA-Isolierung von *Podosphaera leucotricha* nach dem 'CTAB-Protokoll' (modifiziert nach DOYLE und DOYLE, 1987) wurden Konidien mit Hilfe einer Vakuumbloßpumpe (Hybaid, Heidelberg) in eine Pipettenspitze mit Filter gesaugt und in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen nach Kühlung in flüssigem Stickstoff mit Hilfe einer

Schwingmühle zerstoßen. Nach Zugabe von 1 ml erwärmtem CTAB-Puffer (Kapitel 7.2.) wurden die Proben bei 65°C für 30 Minuten inkubiert. Nach einer Aufreinigung mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde der Überstand mit Isopropanol gefällt und in TE-Puffer (1:10 verdünnt, Kapitel 7.2.) resuspendiert. Nach einer RNase-Behandlung wurde die DNA mit Phenol/Chloroform aufgereinigt, mit Ethanol gefällt, getrocknet und in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem in Kapitel 2.2.3.1. beschriebenen Tropfentest.

### 2.3.3.2. RAPD-Analyse

Für eine molekulare Analyse mit Hilfe von RAPD-Primern (WILLIAMS et al., 1990) wurden 25 ng genomischer DNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl 1x Williams-Puffer zusammen mit 100 µMol dNTP's, 0,8 µMol des jeweiligen Primers und 1 unit Taq-Polymerase eingesetzt. Die Proben wurden in 96-well-Mikrotiterplatten mit Mineralöl überschichtet in einem Touchdown Thermocycler (Hybaid, Heidelberg) unter folgenden Reaktionsbedingungen amplifiziert:

1 Zyklus:	5,0 Minuten	94°C	Denaturieren
	1,0 Minuten	35°C	Annealing
	2,0 Minuten	72°C	Polymerisation
38 Zyklen:	0,5 Minuten	94°C	Denaturieren
	1,0 Minuten	35°C	Annealing
	2,0 Minuten	72°C	Polymerisation
1 Zyklus:	0,5 Minuten	94°C	Denaturieren
	1,0 Minuten	35°C	Annealing
	5,0 Minuten	72°C	Polymerisation

Die Auftrennung der in der PCR-Reaktion amplifizierten Fragmente erfolgte auf 1,5%igen Agarosegelen, versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, in 1x TAE-Puffer. Nach einer Laufzeit von drei Stunden bei 120 V wurden die Bandenmuster auf einem UV-Transilluminator mit einer Digitalkamera dokumentiert.

Wenn DNA aus PEX-Isolierung verwendet wurde, ist parallel als Referenz jeweils eine Probe mit DNA des Wirtsgenotyps 'Gibb's Golden Gage' amplifiziert worden. Die Detektion von Markerbanden erfolgte dann im Ausschlußverfahren.

#### 2.3.3.3. AFLP- Analyse

Zur Durchführung der AFLP-Analysen wurde ausschließlich DNA eingesetzt, die nach dem CTAB-Protokoll (Kapitel 2.3.3.1.2.) isoliert worden war. Die Reaktionsbedingungen zur Durchführung von AFLP-Reaktionen wurden bereits in Kapitel 2.2.3.3. beschrieben. Folgende Primerkombinationen wurden in einer gemeinsamen Endreaktion eingesetzt: Mse+Cxx/Eco+Axx (IRD 800) und Mse+Cxx/Eco+Cxx (IRD 700). Insgesamt sind 235 Primerkombinationen an einem Set von sechs Einsporisolaten unterschiedlicher Herkunft (Ahr-2, Ahr-11, France-T4, France-T5, France-T6, GB-153; vergl. Tabelle 3.9.) getestet worden. Um die Reproduzierbarkeit der potentiellen Marker zu gewährleisten, wurde von jedem Isolat die DNA aus zwei unterschiedlichen DNA-Isolierungen parallel eingesetzt. Zur Charakterisierung von polymorphen Fragmenten wurde ein IRD-markierter Längenstandard (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) eingesetzt. Die Charakterisierung aller weiteren Isolate erfolgte auf Basis der mit Hilfe der oben genannten Isolate identifizierten Marker.

#### 2.3.3.4. Erstellen eines genetischen Stammbaums

Für die statistische Auswertung der polymorphen AFLP-Marker sind die DNA-Banden-Informationen zunächst unter MS Excel in eine 1/0-Matrix umgewandelt worden. Die weitere Verrechnung der Daten und die Konstruktion eines Dendrogramms erfolgte mit dem Programmpaket NTSYS-pc Vers. 2.1 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System; Exeter Software, Setauket, New York, USA; ROHLF, 1993). Zunächst wurden mit dem Programmmodul SIMQUAL Werte für genetische Ähnlichkeit (Similaritäts-Koeffizienten) berechnet. Als Koeffizient ist dabei der Jaccard-Koeffizient gewählt worden.

Zur Konstruktion eines Dendrogramms wurden die Similaritäts-Daten mit dem Programmmodul SAHN verrechnet, welches eine Cluster-Analyse durchführt. Die zuvor berechneten Similaritäts-Koeffizienten aller paarweisen Vergleiche erfolgte in Form

einer in den Computer eingegebenen Datenmatrix und wurde mit der Clustermethode UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic average) verrechnet. Das berechnete Dendrogramm konnte schließlich mittels des Grafikmoduls "TREE" graphisch dargestellt werden.

### **2.3.4. Phytopathologische Charakterisierung**

#### **2.3.4.1. Auswahl der Isolate**

Grundlage für die Auswahl der Isolate zur Charakterisierung von *Podosphaera leucotricha* auf phytopathologischer Basis war die molekulare Charakterisierung. Auf der Basis ihrer genetischen Distanz sind Isolate ausgewählt worden, die das gesamte Spektrum des genetischen Stammbaums umfassen und die fünf in der vorliegenden Arbeit bearbeiteten Herkünfte innerhalb Europas repräsentieren. Die Isolate sind in Abbildung 3.11. mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

#### **2.3.4.2. Pflanzenmaterial**

Als Pflanzenmaterial für Inokulationsversuche wurde das in Kapitel 2.1. beschriebene Testsortiment zur Selektion neuer Mehlttauresistenzquellen ausgewählt. Es ist davon ausgegangen worden, dass hier eine ausreichend große genetische Variabilität hinsichtlich der Mehlttauanfälligkeit vorliegt.

Eine Pflanze von jedem Genotyp des Testsortiments wurde in Container gepflanzt und durch Isolation in einer Gewächshauskabine befallsfrei kultiviert. Zu Beginn der Kultur ist eine Fungizidbehandlung mit 'Euparen' durchgeführt worden. Durch eine stickstoffbetonte Düngung mit 3 g/l Erde 'Plantosan' und einen regelmäßigen Rückschnitt wurde ein gleichmäßiger Neutrieb erreicht.

#### **2.3.4.3. Inokulation von Zweigen**

Im Spätwinter, nach Befriedigung des Kältebedürfnisses, wurden einjährige Langtriebe von den zu testenden Genotypen auf dem Versuchsfeld geschnitten und bis zur Verwendung im Kühlraum bei +2°C in feuchten Sand gesteckt gelagert. Zweigab-

schnitte wurden nach Bedarf in 50 ml-Erlenmeyerkolben, welche sich in geschlossene 500ml-Weckgläsern befanden, gestellt und in einem Klimaschrank bei +20°C, 70% Luftfeuchte und 16 Stunden Licht angetrieben. Sobald die ersten Laubblätter erschienen waren, wurden diese durch Überstreichen von Blättern aus *in vitro*-Kultur, die mit einem Einsporisolat infiziert waren, inokuliert. Nach weiteren 10 Tagen im Klimaschrank unter oben genannten Bedingungen konnte der Befall ausgewertet werden. Aufgrund der nicht standardisierten Inokulationsbedingungen wurden nur zwei Befallsklassen erfasst:

Befallsklasse 1: Kein Befall feststellbar

Befallsklasse 2: Deutlich sporulierender Befall

Die Laubblätter wurden mit Hilfe eines Binokulars auf Befall untersucht. Um eine Verbreitung standortfremder Isolate auszuschließen wurden alle inokulierten Zweige vor ihrer Entsorgung in dem geschlossenen Weckglas-System autoklaviert (20 Minuten, 121°C, 1,2 bar).

#### 2.3.4.4. Inokulation von Einzelblättern

Für die Inokulation von Einzelblättern wurden junge, noch nicht ausgewachsene Laubblätter von mehltaufreien Pflanzen aus einer Gewächshauskabine (Kapitel 2.3.4.2.) ohne vorherige Oberflächensterilisation auf Benzimidazol-Agar [35 mg/l Benzimidazol, 30% Sorbitol, 7% Difco Bitek-Agar (Otto Nordwald, Hamburg)] in Glas-Petrischalen aufgelegt. Die Petrischalen mit den Blättern wurden über Nacht in einem Kulturraum bei +22°C zwischengelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Inokulation in einem Inokulationsturm (LINDE und DEBENER, 2002). Dafür wurden die Petrischalen mit den zu inokulierenden Blättern offen auf den Boden des Inokulationsturms gestellt. Für die Inokulation sind Konidien eines Einsporisolats mit Hilfe von Druckluft von infizierten *in vitro* – Sprossen in den Turm geblasen worden. Die Bestimmung der Konidiendichte auf den inokulierten Blättern erfolgte mit Hilfe von Objektträgern, die zwischen den Petrischalen im Inokulationsturm platziert worden sind. Die darauf aufliegenden Konidien konnten im Sichtfeld eines Binokulars ausgezählt werden. Die angestrebte Konidiendichte lag bei fünf Konidien pro mm<sup>2</sup>. Anschließend wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und im Kulturraum bei 22°C bei 4000 Lux Auflicht im 16-Stunden-Tag kondenswasserfrei kultiviert. Nach 10 Tagen konnte der Befall mit Hilfe eines Binokulars ausgewertet werden. Aufgrund

konnte der Befall mit Hilfe eines Binokulars ausgewertet werden. Aufgrund einer nicht kontrollierbaren schnellen Verbräunung von Blattbereichen als Folge kleinster Verletzungen sind auch hier nur zwei Befallsklassen berücksichtigt worden:

Befallsklasse 1: Kein Befall feststellbar

Befallsklasse 2: Deutlich sporulierender Befall

Die Petrischalen wurden nach der Auswertung autoklaviert, um einer möglichen Ausbreitung standortfremder Isolate auszuschließen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Charakterisierung neuer Resistenzquellen

Im Rahmen eines europaweiten Anbauversuchs sind die in Tabelle 3.1. aufgeführten Genotypen an den fünf Standorten Ahrensburg, Dresden-Pillnitz, East Malling /England, Wädenswil/Schweiz, und Angers/Frankreich in drei aufeinander folgenden Vegetationsperioden hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens geprüft worden.

Am Standort Ahrensburg konnte im Freiland lediglich an der Sorte 'Gibb's Golden Gage' leichter Mehltaubefall festgestellt werden. Ergebnisse aus dem Freiland sind deshalb bei der Gesamtauswertung nicht berücksichtigt worden.

Da der offensichtlich geringe Mehltau-Infektionsdruck am Standort Ahrensburg eine zuverlässige Infektionsbewertung im Freiland unmöglich machte, sind in einem offenen Folientunnel optimale Infektionsbedingungen für den Erreger geschaffen worden (Kapitel 2.2.1.3). Um die Gefahr von Wassermangelschäden zur Hauptwachstumszeit auszuschließen, wurden die Pflanzen nicht in Containern kultiviert, sondern direkt in das Erdreich gepflanzt. Durch das morgendliche Besprühen mit Wasser von unten wurde Morgentau simuliert. Das Foliendach ermöglichte eine schnelle Lufterwärmung am Morgen, was zusammen mit der durch offene Seitenwände gewährleisteten Luftbewegung ein schnelles Abtrocknen der Pflanzen förderte und somit zur optimalen Verbreitung der Konidien beitrug. Die Gewährleistung einer konstanten Bodenfeuchtigkeit förderte eine hohe Luftfeuchte im Pflanzenbestand, welches die Konidienkeimung begünstigt. Unter diesen Bedingungen herrschte ein gleichmäßig hoher Infektionsdruck innerhalb des gesamten Bestandes.

In drei aufeinander folgenden Vegetationsperioden konnte im Folientunnel mindestens eine Befallserfassung pro Jahr durchgeführt werden. Zwar war für jeden Herbst eine zweite Befallserfassung geplant, diese konnten aber wegen nicht vorhergesehener Umweltbedingungen wie Mikronährstoffmangelsymptomen (Jahr 2000) und starkem Schadinsektenbefall im Bereich des Neuaustriebs (Jahr 2001) nicht regelmäßig ausgeführt werden. Auftretender Befall war ausschließlich auf junge, im Wachstum befindliche Pflanzenteile beschränkt. In Tabelle 3.1. sind die Boniturergebnisse für das Testsortiment am Standort Ahrensburg dargestellt. Jeder Baum eines Genotyps ist einzeln einer Boniturklasse von 0 bis 5 (Kapitel 2.1.) zugeordnet worden.

**Tabelle 3.1.:** Mehltreuebefall im Testsortiment am Standort Ahrensburg in den Jahren 1999 bis 2001. Zuordnung von Einzelbäumen zu Boniturklassen.

<b>Genotyp</b>	<b>1999 1. Bonitur</b>	<b>1999 2. Bonitur</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>
<b>Sorten</b>				
'Alkmene'	0 0	0 1	1 3	1 2
'Carola'	1 4	0 5	1 2	3 3
'Danziger Kant'	1 0 0	0 0 0	2 0 3	3 3 2
'Delicious'	0 0 0	2 0 0	2 3 1	3 3 3
'Democrat'	0 0	0 0	1 0	1 1
'Dülmener Rosenapfel'	0 0	0 0	0 0	0 0
'Glockenapfel'	0 0	0 0	1 0	2 1
'James Grieve'	0 1	0 2	2 0	3 2
'Laxton's Superb'	0 0	0 1	2 2	2 2
'Lord Lambourne'	0 0 0	0 1 0	0 0 1	0 1 2
'Maiden's Blush'	0 0 0	1 0 0	0 1 0	2 1 2
'Melba'	0 1	0 3	1 1	2 2
'Peasgood's Nonesuch'	0 0	0 0	0 1	0 2
Pi-AS-22/17	2 0	0 0	1 2	0 3
'Rewena'	0 0	2 0	2 0	3 2
'Roter Berlepsch'	1 0	0 0	2 1	2 2
'Rote Sternrenette'	0 0 0	0 2 0	0 0 0	0 0 1
'Stirling Castle'	0 0 0	0 1 1	1 0 0	3 0 0
'Tydeman's Late Orange'	1 1	0 0	1 1	3 3
'Worcester'	0 0 0	2 2 0	0 2 0	3 2 1
<b>Anfällige Kontrollsorten</b>				
'Jonathan'	5 1	5 1	4 3	5 4
'Gibb's Golden Gage'	5 5 4	5 4 3	4 3 4	4 4 4
<b>Schorfresistente Sorten</b>				
'Discovery'	0 0	0 0	0 0	1 1
TN 10-8	0 0 0	1 0 1	1 3 1	1 2 1
'Durello di Forli'	0 2	0 3	0 3	2 3
'Fiesta'	0 0	2 0	1 1	3 4
'Prima'	0 4	2 3	2 3	3 2
<b>Wildarten und Wildartderivate</b>				
<i>Malus robusta persicifolia</i>	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>Malus zumi calocarpa</i>	3	3	0	0
<i>Malus hupehensis</i> (Pilln.)	0 0	0 0	0 0	0 0
E 334-62 ( <i>M. hupehensis</i> )	0 0	0 0	0 0	0 0
89/9-4 ('White Angel'-Säml.)	0 0 0	3 0 1	3 0 0	0 0 3
E 295-4 ('White Angel'-Säml.)	0 0	0 0	0 0	0 0
D 12 (Original)	0 0	0 0	0 0	0 0
A 871-14 (D12)	0	0	0	0
Mildew Immune Seedling	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
<i>Malus baccata</i> 'Jackii'	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>Malus bacc.</i> mandshurica	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
<i>Malus trilobata</i>	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
<i>Malus coronaria</i>	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>Malus sylvestris</i>	0 0	0 0	0 1	0 1

Wie in Tabelle 3.1. zu erkennen ist, hat der Anteil anfälliger Pflanzen von Jahr zu Jahr zugenommen. Als Ergebnis der vier Befallserfassungen wurden alle Genotypen des Testsortiments einer der drei Bewertungsstufen, "resistent", "feldresistent" oder "anfällig", zugeordnet (Tabelle 3.2.).

**Tabelle 3.2.:** Einteilung der *Malus*-Genotypen des Testsortiments in drei Bewertungsstufen

<b>Resistent</b>	<b>'Feldresistent'</b>	<b>Anfällig</b>
'Dülmener Rosenapfel'	'Democrat'	'Alkmene'
'Rote Sternrenette'	'Lord Lambourne'	'Carola'
'Discovery'	Pi-As-22/17	'Danziger Kantapfel'
<i>M. robusta</i> persicifolia	'Melba'	'Delicious'
<i>M. hupehensis</i>	'Peasgood's Nonesuch'	'James Grieve'
E 295-4 ('White Angel')	'Roter Berlepsch'	'Laxton's Superb'
D 12 (Original)	'Stirling Castle'	'Rewena'
Mildew Immune Seedling	<i>M. sylvestris</i>	'Tydelan's Late O.'
<i>M. baccata</i> 'Jackii'	'Maiden's Blush'	'Worcester'
<i>M. bacc.</i> mandshurica	'Glockenapfel'	'Jonathan'
<i>M. trilobata</i>	TN 10-8	'Gibb's Golden Gage'
<i>M. coronaria</i>		'Jonathan'
A 871-14 (D12)		'Fiesta'
		'Durello di Forli'
		'Prima'
		<i>M. zumi</i> calocarpa
		89/9-4 ('White Angel')

Die beiden anfälligen Kontrollsorten ('Jonathan' und 'Gibb's Golden Gage') waren zu allen vier Befallserfassungsterminen stark befallen. Der Infektionsdruck im offenen Folientunnel war somit ausreichend hoch für die Bewertung von Resistenz im Testsortiment.

Als besonders widerstandsfähig im Bereich der Kultursorten haben sich am Standort Ahrensburg 'Dülmener Rosenapfel', 'Rote Sternrenette' und 'Discovery' herausgestellt. Erwartet resistent waren im Wildartbereich Genotypen mit monogen dominanter Resistenz wie *M. robusta* persicifolia (Pl<sub>1</sub>), E 295-4 ('White Angel'-Derivat, Pl<sub>w</sub>), D12 (Pl<sub>d</sub>), A871-14 (D12-Derivat, Pl<sub>d</sub>) und 'Mildew Immune Seedling'. In der *Malus*-Genbank in Dresden-Pillnitz als resistent charakterisierte Wildarten (M. GEIBEL, pers. Mitteilung) wie *Malus baccata* mandshurica, *Malus baccata* 'Jackii', die beiden *Malus hupehensis*-Genotypen, *Malus trilobata* und *Malus coronaria* blieben ebenfalls be-

fallsfrei. Entgegen der Erwartung waren der getestete Genotyp von *Malus zumi calocarpa* (soll  $PI_2$ -Träger sein) und 89/8-4 (ein 'White Angel'-Derivat, soll  $PI_w$ -Träger sein) anfällig. *Malus sylvestris* (laut M. GEIBEL, pers. Mitteilung, resistent) wurde am Standort Ahrensburg nur mit 'feldresistent' bewertet. Zehn Kultursorten konnten als feldresistent eingestuft werden, dreizehn Kultursorten waren anfällig.

### 3.2. Kartierung des Resistenzgens $PI_1$

Um Marker zu identifizieren, die enger mit  $PI_1$  gekoppelt sind als der SCAR-Marker AT20-450 (MARKUSSEN, 1996), ist die spaltende Nachkommenschaft 99/2, bestehend aus 404 Sämlingen, erstellt worden (vergleiche Kapitel 2.2.1.). Die Befallsdaten der Nachkommenschaft stellen die Grundlage für die anschließende Markeranalyse dar.

#### 3.2.1. Befallsanalyse

In den Jahren 1999 bis 2001 sind die Sämlinge der Nachkommenschaft 99/2 hinsichtlich ihres Befalls mit dem Erreger *Podosphaera leucotricha* geprüft worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3. dargestellt worden.

**Tabelle 3.3.:** Resistenzverhalten der spaltenden Nachkommenschaft 99/2

Jahr	n	gesund	anfällig	Spaltung	$\chi^2$	Abweichung signifikant?
1999	404	235	169	1:1	10,7	ja
				5:3	3,23	nein
2000	404	257	147	1:1	29,95	ja
				5:3	0,15	nein
2001	404	189	215	1:1	1,67	nein
				5:3	42,58	ja

197 Sämlinge (48,8 %) waren klar anfällig, und 135 Sämlinge (33,4 %) waren eindeutig als resistent zu klassifizieren. 72 Sämlinge (17,8 %) konnten aufgrund der Befallsdaten aus den drei Vegetationsperioden nicht eindeutig als resistent oder anfällig eingestuft werden. Eine Einbeziehung dieser Genotypen in die Kopplungsanalyse war deshalb nicht möglich.

Wenn davon ausgegangen wird, dass es sich bei der  $Pl_1$ -Resistenz um ein monogen dominant vererbtes Merkmal handelt, kann in der Kartierungspopulation 99/2 eine 1:1-Spaltung in anfällige und resistente Pflanzen erwartet werden. Da jedoch nicht alle Genotypen aus der Kartierungspopulation nach drei Jahren eindeutig als resistent oder anfällig eingestuft werden konnten, ist für jedes Befallserfassungsjahr getrennt ein  $\chi^2$ -Test durchgeführt worden. Bei  $\chi^2_{1;0,95} < 3,84$  lagen für die Hypothese einer 1:1-Spaltung nur die Daten aus dem Jahr 2001 im Signifikanzbereich. Für die Jahre 1999 und 2000 ist dagegen die Hypothese einer 5:3-Spaltung signifikant, was auf die Beteiligung weiterer Gene an der Resistenz hindeuten würde.

### 3.2.2. “Bulked-Segregant-Analyse”

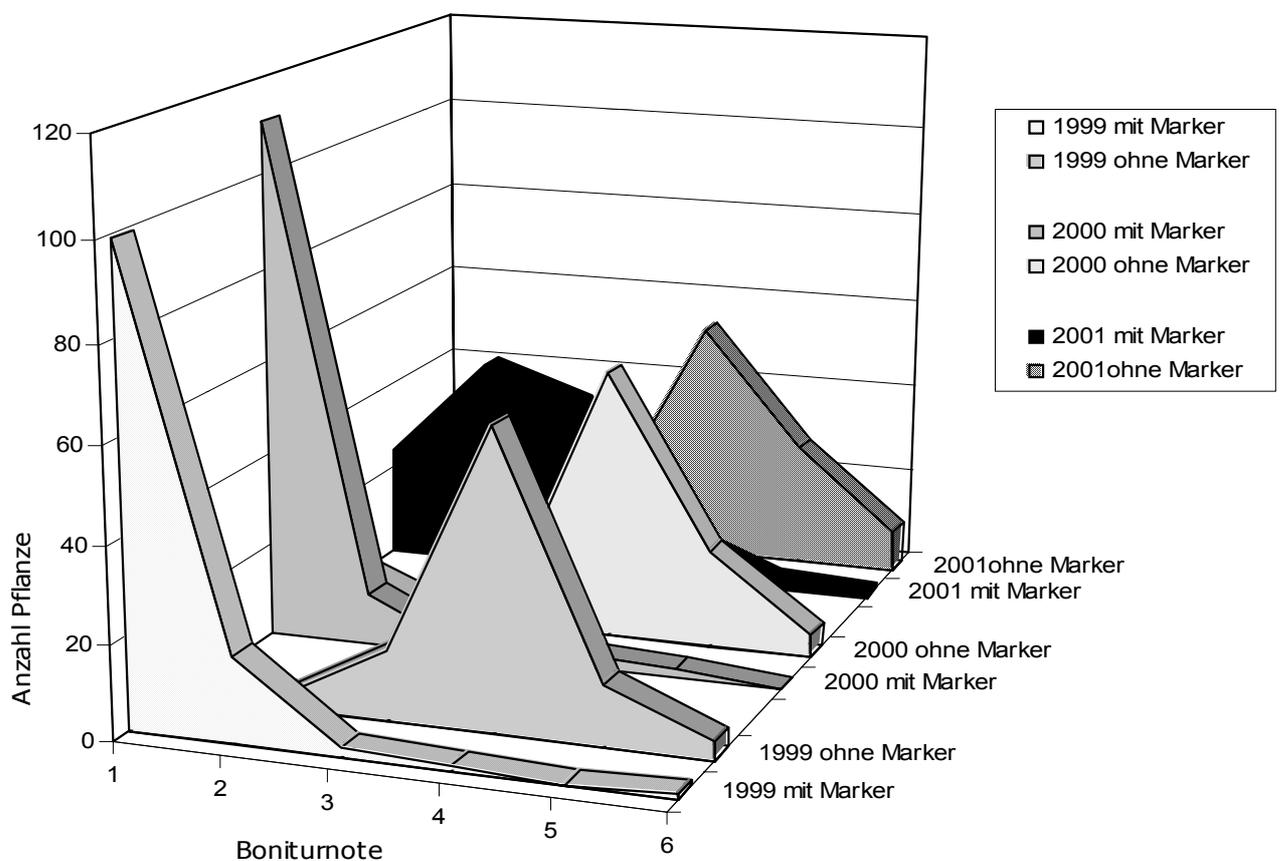
Zur Identifizierung neuer molekularer Marker für  $Pl_1$  ist eine AFLP-gestützte “Bulked-Segregant-Analyse” durchgeführt worden. Für die Erstellung der vier Bulks ist neben den Boniturergebnissen des ersten Jahres zusätzlich eine Verifizierung der Resistenzdaten mit Hilfe des SCAR-Markers AT20-450 (MARKUSSEN, 1996) durchgeführt worden. Bei drei der 40 ausgewählten Sämlinge stimmte das Boniturergebnis nicht mit den erhaltenen Markerdaten überein. Das bedeutet, dass hier entweder die Befallserfassung unzureichend war oder aber ein Rekombinationsereignis zwischen dem Markerlocus und  $Pl_1$  stattgefunden hat. Diese Genotypen wurden deshalb bei der Zusammenstellung der Bulks zunächst nicht berücksichtigt. In einem ersten Schritt sind die vier Bulks mit 540 AFLP-Primerkombinationen getestet worden. Bei durchschnittlich 36 auswertbaren Banden pro Primerkombination konnten insgesamt 52 Polymorphismen, entsprechend 0,28 %, zwischen den Bulks von resistenten und jenen von anfälligen Sämlingen identifiziert werden. Eine Überprüfung dieser potentiellen Markerkandidaten auf Einzelpflanzenbasis ergab sieben Marker mit offensichtlicher Kopplung an  $Pl_1$ . Die Überprüfung der drei zunächst nicht berücksichtigten rekombinanten Genotypen mit den identifizierten Markern deutete darauf hin, dass zwei der Marker, AFLP1 und AFLP2, enger an  $Pl_1$  gekoppelt sein mussten als der SCAR-Marker AT20-450. Um den Abstand der Marker zu  $Pl_1$  genauer festzulegen, sind 158 Genotypen aus der Nachkommenschaft 99/2 anhand ihrer Befallsdaten ausgewählt worden. Die Anzahl der Genotypen wurde einerseits durch das Fehlen eindeutiger Boniturdaten und andererseits durch den Arbeitsaufwand zur AFLP-Erstellung limitiert. Der auf-

aufgrund der Rekombinationshäufigkeit berechnete Abstand von fünf dieser Marker zu  $PI_1$  ist in Tabelle 3.4. dargestellt. Zwei der identifizierten Marker sind nicht weiter berücksichtigt worden, weil sie innerhalb der 40 Genotypen, die zur Erstellung der Bulks verwendet worden waren, mit dem am weitesten von  $PI_1$  entfernten Marker AFLP5 cosegregierten.

**Tabelle 3.4.:** AFLP-Marker für  $PI_1$

Marker	Primerkombination	Anzahl Nachkommen	resistent		anfällig		Rekombination	Abstand zu $PI_1$
			mit Marker	ohne Marker	mit Marker	ohne Marker		
AFLP1	M-CCT E-CCC	158	94	3	2	59	3,2%	3 cM
AFLP2	M-CCA E-CGT	158	95	2	3	58	3,2%	3 cM
AFLP3	M-CAC E-AGC	158	87	10	2	59	7,6%	8 cM
AFLP4	M-CCG E-CCT	158	71	26	6	55	20,3%	20 cM
AFLP5	M-CCT E-CCC	158	73	24	6	55	19,0%	19 cM
AT20-450 SCAR		273	113	12	6	142	6,6%	7 cM

In Abbildung 3.1. ist der Zusammenhang der Markerdaten mit den Boniturergebnissen graphisch dargestellt.



**Abb.3.1.:**

Boniturergebnisse in Abhängigkeit von den Markerdaten (AFLP1) in den Jahren 1999, 2000 und 2001

Pflanzen der Boniturnote 1 und 2 haben bis auf wenige Ausnahmen den Marker, während Genotypen, bei denen das Markerfragment nicht amplifiziert werden konnte, zum größten Teil die Boniturnote 3 bis 6 erhalten hatten. Selbst im dritten Jahr, in dem ein sehr hoher Befallsdruck vorherrschte, konnten resistente Genotypen mit dem Marker AFLP1 immer noch von anfälligen Genotypen abgegrenzt werden.

Die Abweichung der Boniturnoten von der in Kapitel 2.1. dargestellten Einteilung in Boniturstufen ist Computerprogramm-bedingt: Die Klasse 0 wurde von MS Exel in die Note 1 umgewandelt, so dass die Boniturstufe addiert mit eins der jeweiligen Boniturnote entspricht.

Zur Überprüfung der Kopplung von Vorhandensein der Markerbande und dem Auftreten von Resistenz ist ein Vierfelder- $\chi^2$ -Test auf Unabhängigkeit (WEBER, 1978) durchgeführt worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5. wiedergegeben.

Bei  $\chi^2_{1; 0,05} > 3,84$  liegt ein Zusammenhang zwischen Markerpräsenz und Resistenz vor. Je höher  $\chi^2$ , desto eindeutiger ist dieser Zusammenhang.

**Tabelle 3.5.:** Vierfelder-  $\chi^2$ -Test auf Unabhängigkeit der Boniturergebnisse in drei Vegetationsperioden mit dem Marker AFLP1 (n= 158)

Jahr	Resistent		Anfällig		$\chi^2$	$\alpha$
	mit Marker	ohne Marker	mit Marker	ohne Marker		
1999	94	10	2	52	112	0,05
2000	94	7	2	55	122,6	0,05
2001	93	6	3	56	122,4	0,05
gesamt	93	2	3	60	139,4	0,05

Die sehr hohen  $\chi^2$ -Werte in Tabelle 3.5. zeigen, dass in jedem der drei Boniturstufenjahre ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Markerpräsenz und Resistenz vorlag. Jedoch zeigt der  $\chi^2$ -Wert in der Zeile 'gesamt', dass die Aussagekraft der Boniturergebnisse am größten ist, wenn die Bewertung eines Genotypen auf Grund aller drei Befallserfassungsjahre erfolgt ist.

Um weitere Marker für  $Pl_1$  zu identifizieren, die im Intervall zwischen den am engsten gekoppelten Markern AFLP1 und AFLP2 und  $Pl_1$  oder aber auf der anderen Seite des Gens liegen, ist in einem zweiten Ansatz eine "Narrow-Down-Bulked-Segregant-Analyse" modifiziert nach XU und KORBAN (2000) durchgeführt worden. Es wurden zwei neue Bulks mit resistenten Genotypen aus 99/2 gebildet. Bulk 5 bestand aus

Genotypen, die nur mit den beiden am engsten gekoppelten Markern, AFLP1 und AFLP2, als resistent zu identifizieren waren. Bulk 6 wurde aus Genotypen gebildet, die zusätzlich auch mit dem SCAR-Marker AT20-450 als resistent identifizierbar waren. Die Bulks aus anfälligen Pflanzen, Bulk 3 und Bulk 4, entsprachen jenen der ersten 'Bulked-Segregant-Analyse'. Unter Verwendung der neuen Bulks sind 260 AFLP-Primerkombinationen mit Mse+Txx – Primern getestet worden, wobei 10 mögliche Markerkandidaten identifiziert wurden. Die Überprüfung auf Einzelpflanzenbasis führte zu zwei weiteren Markern, AFLP6 und AFLP7, mit offensichtlicher Kopplung an  $Pl_1$ . Die Rekombinationsfrequenz ergab in beiden Fällen jedoch einen größeren Abstand zu  $Pl_1$ , als er für AFLP1 und AFLP 2 berechnet worden war. Die Abstände von AFLP6 und AFLP7 zu  $Pl_1$  sind in Tabelle 3.6. dargestellt.

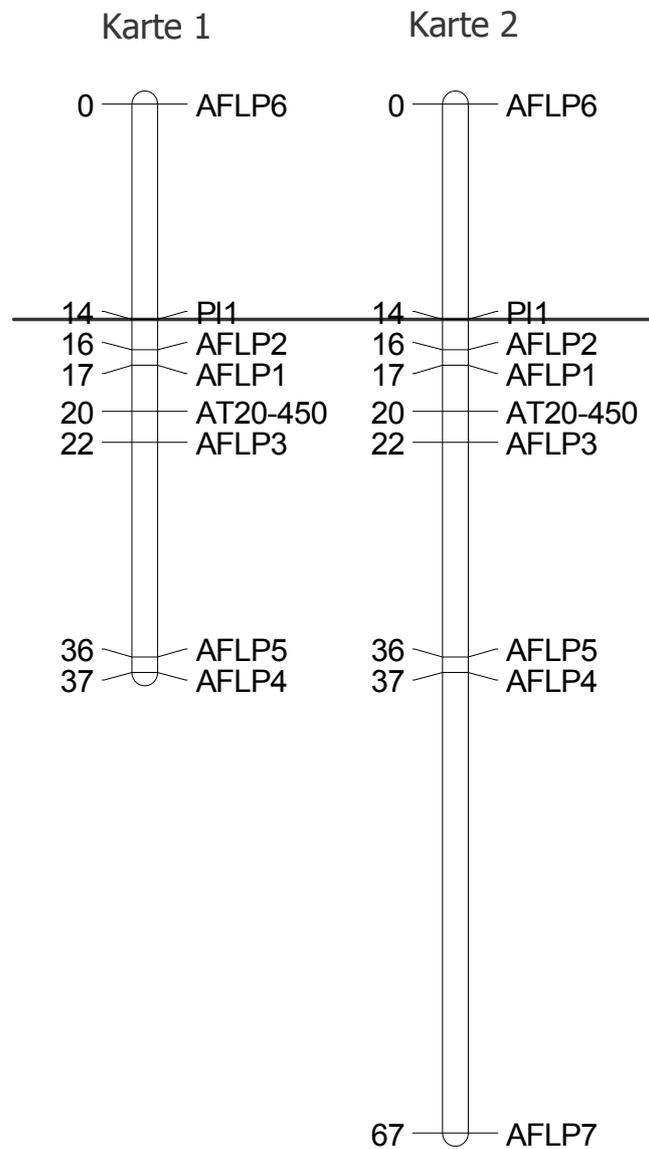
**Tabelle 3.6.:** Vergleich der Marker AFLP6 und AFLP7 mit AFLP1 und AFLP2

Marker	Primerkombination	Anzahl Nachkommen	resistent		anfällig		Rekombination	Abstand zu $Pl_1$
			mit Marker	ohne Marker	mit Marker	ohne Marker		
AFLP1	M-CCT E-CCC	158	94	3	2	59	3,2%	3 cM
AFLP2	M-CCA E-CGT	158	95	2	3	58	3,2%	3 cM
AFLP6	M-TGA E-ACC	158	75	22	3	58	15,2%	15 cM
AFLP7	M-TGA E-ACG	155	68	29	25	33	34,8%	35 cM

### 3.2.3. Kopplungskarte für $Pl_1$

Um die Marker in ihrer Position zum Genort und zueinander genauer gruppieren zu können, ist eine Kopplungskarte für  $Pl_1$  erstellt worden. Für die Erstellung mit Hilfe des Programms "JoinMap 3.0" wurden 158 Einzelpflanzen aus der Kartierungspopulation 99/2 ausgewählt, die eindeutig als resistent oder anfällig eingestuft werden konnten. Fünf der sieben Marker, welche aus der "Bulked-Segregant-Analyse" mit Bulks 1, 2, 3 und 4 hervorgegangen sind, genannt AFLP1 bis AFLP5, sowie die beiden Marker aus der "Narrow-Down-Bulked-Segregant-Analyse", genannt AFLP6 und AFLP7, wurden berücksichtigt. Die Kopplung von AFLP7 mit  $Pl_1$  ist wegen des zugrundegelegten LOD-Werts von 2.0 nicht gesichert. LOD bedeutet "log of odds" und gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine Behauptung zutrifft. Je höher der LOD-Wert, desto gesicherter ist die Karte. Ein LOD-Wert von 3.0 bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit, dass Kopplung vorliegt,  $10^{-3}$  mal so hoch ist wie die Wahrscheinlich-

keit, dass keine Kopplung besteht. Bei einem LOD-Wert von 2.0 liegt die Wahrscheinlichkeit dafür bei  $10^{-2}$ . Nach VAN OOIJEN (1999) ist ein LOD-Wert von 3.0 bei dikotylen Pflanzen ausreichend für ein statistisch abgesichertes Ergebnis.



**Abb. 3.2:** Lokale Karte um den Mehltaresistenz-Locus *PI1*, basierend auf 158 Einzelpflanzen aus der Kartierungspopulation 99/2. Karte 1 beruht auf einem LOD-Wert von 3.0, Karte 2 wurde ein LOD-Wert von 2.0 zugrunde gelegt.

Wie in Abb. 3.2. zu erkennen ist, sind alle Marker, die in der "Bulked-Segregant-Analyse" mit den Bulks 1, 2, 3 und 4 identifiziert worden waren, auf einer Seite des Gens lokalisiert. Dies war aufgrund der Gleichheit der identifizierten Rekombinanten (vergleiche Kapitel 7.5.) auch erwartet worden. AFLP 2 ist mit etwa 2 cM am engsten an  $Pl_1$  gekoppelt. Der in der "Narrow-Down-Bulked-Segregant-Analyse" identifizierte Marker AFLP6 ist zwar nicht enger an  $Pl_1$  gekoppelt als AFLP2, jedoch konnte er auf der anderen Seite des Gens lokalisiert werden, so dass nun flankierende Marker für  $Pl_1$  vorliegen. Die Annahme, dass  $Pl_1$  am Ende einer Kopplungsgruppe lokalisiert ist, welche aufgrund der "Bulked-Segregant-Analyse" mit den Bulks 1, 2, 3 und 4 aufgestellt worden war, wurde damit widerlegt.

In Abbildung 3.2. sind zwei Karten des  $Pl_1$ -Locus dargestellt. Der 'Karte 1' beruht auf einem LOD-Wert von 3.0, "Karte 2" wurde dagegen nur ein LOD-Wert von 2.0 zugrunde gelegt. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Kopplung zwischen den Markern und  $Pl_1$  vorliegt, ist somit in "Karte 1" um ein vielfaches höher als in "Karte 2". Da AFLP7 in "Karte 1" nicht enthalten ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Kopplung von AFLP7 an  $Pl_1$  statistisch nicht abgesichert ist.

#### 3.2.4. SCAR-Marker-Entwicklung

Um einen Einsatz der neu identifizierten Marker im Rahmen einer markergestützten Selektion zu vereinfachen, wurde eine Umwandlung der beiden am engsten gekoppelten AFLP-Marker, AFLP1 und AFLP2, in SCAR-Marker angestrebt. Eine Sequenzierung der ausgeschnittenen und klonierten AFLP-Banden zeigte, dass für beide Marker ein Gemisch aus zwei Fragmenten gleicher Größe isoliert worden war. Da nicht bekannt war, welches das Markerfragment darstellt, wurden für beide Fragmente SCAR-Marker erstellt. Die Primerkombinationen waren wie folgt:

AFLP1, Fragment 1:

Die Annealingtemperatur betrug 58°C. Die Primersequenzen waren wie folgt:

1-forward: 5'-AAC CTT CAT TTC ACC CTA CAT-3'

1-reverse: 5'-AAT TCC CCT GTT TGT TTC TC-3'

## AFLP1, Fragment 2:

Die Annealingtemperatur betrug 52°C. Die Primersequenzen waren wie folgt:

2-forward: 5'-AAC CTA AGG TGC TAG TTG-3'

2-reverse : 5'-AAT TCC CCT TGC AT-3'

## AFLP2, Fragment 1:

Die Annealingtemperatur betrug 55°C. Die Primersequenzen waren wie folgt:

3-forward: 5'-AAT TCC GTG AGT ATT ATG TGC-3'

3-reverse : 5'-TAA CCA TAC TAT GCC CAA TTT-3'

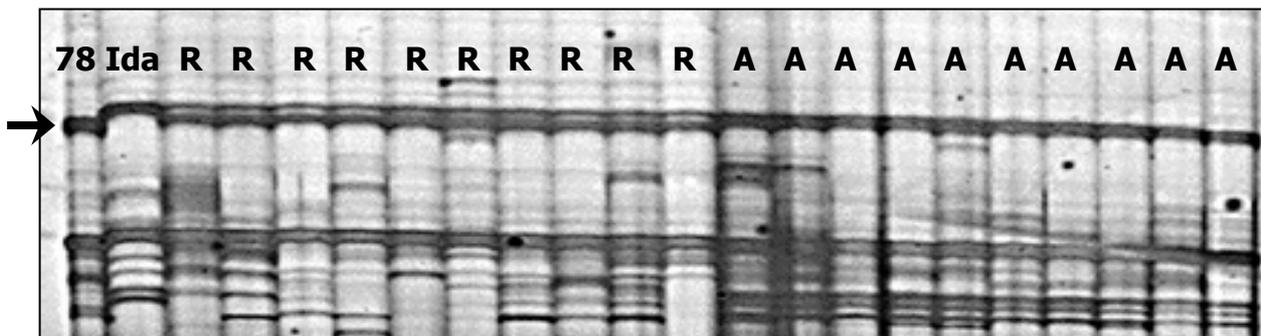
## AFLP2, Fragment 2:

Die Annealingtemperatur betrug 58°C. Die Primersequenzen waren wie folgt:

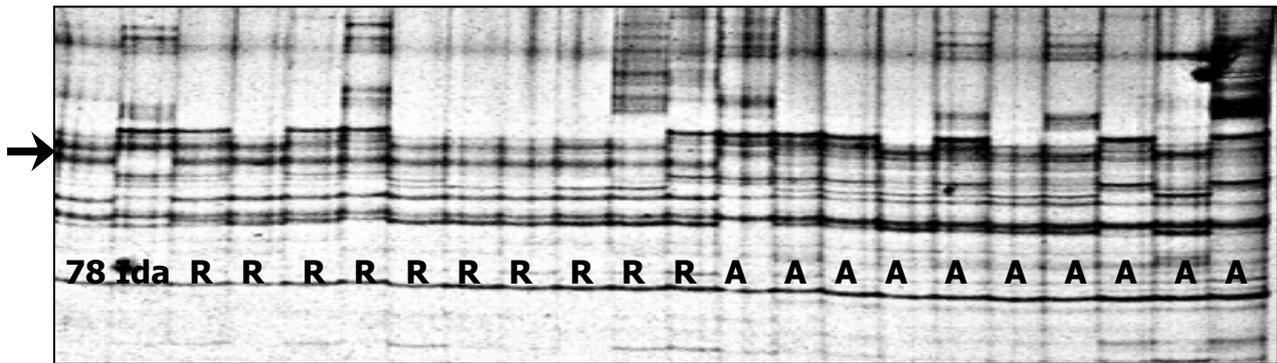
4-forward: 5'-AAT TCC GTC TGA GAG TCA TC-3'

4-reverse : 5'-TAA CCA GCC CTC TGA TAA AC-3'

Im Bezug auf AFLP1 stellten sich der Primer für Fragment 1 (Primer "1") als derjenige heraus, dessen Amplifikationsprodukt auf Agarosegelen als eine Bande der erwarteten Fragmentgröße zu erkennen war. Dieser Marker wird im Folgenden mit AU1a-SCAR bezeichnet. Im Bezug auf AFLP2 war dies für den Primer von Fragment 2 (Primer "4") der Fall. Dieser Marker wird im Folgenden mit AU2a-SCAR bezeichnet. Sowohl bei AU1a-SCAR als auch bei AU2a-SCAR war das Amplifikationsprodukt jedoch nicht auf Agarosegelen als polymorpher Marker auswertbar. Erst eine Auftrennung auf MDE-Gelen unter Verwendung der SSCP-Technik (Kapitel 2.2.3.6.) machte dies möglich. Die auf Agarosegelen erkennbare Einzelbande wurde hier in ein relativ komplexes Bandenmuster aufgetrennt, wie in den Abbildungen 3.3. und 3.4. zu erkennen ist.



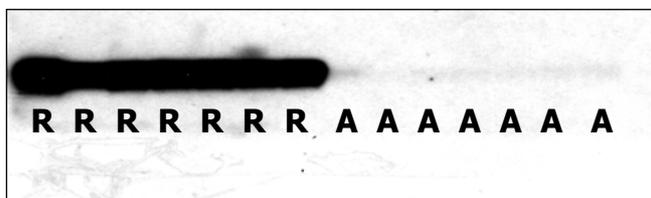
**Abb. 3.3.:** Bandenmuster des AU1a-SCARs nach Auftrennung mit Hilfe der SSCP-Technik (78= resistenter Elter 78/18-4, Ida= anfälliger Elter 'Idared', R= resistente Sämlinge aus der Kartierungspopulation 99/2, A= anfällige Sämlinge aus der Kartierungspopulation 99/2)



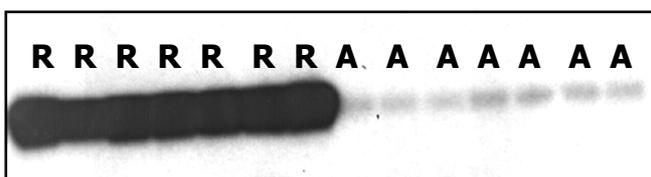
**Abb. 3.4:** Bandenmuster des AU2a-SCARs nach Auftrennung mit Hilfe der SSCP-Technik (78= resistenter Elter 78/18-4, Ida= anfälliger Elter 'Idared', R= resistenter Sämling aus der Kartierungspopulation 99/2, A= anfälliger Sämling aus der Kartierungspopulation 99/2)

Bei beiden Primern konnte jeweils eine Bande, in den Abbildungen mit einem Pfeil markiert, als diejenige identifiziert werden, welche in der Nachkommenschaft 99/2 mit dem Auftreten von Resistenz korreliert war. Zur Verifizierung der erhaltenen Daten ist das Amplifikationsprodukt der SCAR-PCR von anfälligen und resistenten Genotypen als radioaktiv markierte Sonde in einer Hybridisierung der ursprünglichen AFLP-Reaktion eingesetzt worden. Dafür wurden für jeden der beiden AFLP-Marker jeweils sieben Reaktionen von anfälligen und von resistenten Genotypen auf 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Reaktionsprodukte wurden mit der Southern-Blot-Technik (SAMBROOK und RUSSELL, 2001) auf Nylonmembranen übertragen und mit den markierten Sonden hybridisiert. In Abb.3.5. ist dies für AFLP1 und die Sonden aus der Amplifikation von AU1a-SCAR dargestellt.

Unabhängig von der Herkunft der Sonde hybridisierte diese jeweils nur mit einem Fragment der ursprünglichen AFLP-Amplifikation von resistenten Genotypen, nicht jedoch mit dem AFLP-PCR-Produkt von anfälligen Pflanzen.



**Abb. 3.5.a:** Hybridisierung der Sonde 'AU1a SCAR-resistent' mit dem Bandenmuster von AFLP1 (R= resistenter Genotyp, A= anfälliger Genotyp)



**Abb. 3.5.b:** Hybridisierung der Sonde 'AU1a SCAR-anfällig' mit dem Bandenmuster von AFLP1 (R= resistenter Genotyp, A= anfälliger Genotyp)

Damit konnte gezeigt werden, dass die Sequenzunterschiede zwischen dem Fragment von anfälligen Genotypen und dem von resistenten Genotypen sehr gering sein mussten. Ein Sequenzvergleich der SCAR-Fragmente von resistentem und anfälligem Elter ergab nur sehr geringe Basenunterschiede. Im Falle von AU1a-SCAR konnten zwei Basen ( in Abb. 3.6. rot markiert), im Fall von AU2a-SCAR drei Basen Sequenzunterschied identifiziert werden. Bei beiden Markerfragmenten waren die Basenunterschiede einzeln im mittleren Teil des Fragments lokalisiert.

		10	20	30	40	50	
AFLP1A.DNA	1	AATTCCGCTG	TTTGTTCCTC	ATATCATATA	TTGATATCAT	AATTGTTTTG	50
REV781A0.DNA	1	AATTCCGCTG	TTTGTTCCTC	ATATCATATA	TTGATATCAT	AATTGTTTTG	50
FOR781A0.DNA	1	AATTCCGCTG	TTTGTTCCTC	ATATCATATA	TTGATATCAT	AATTGTTTTG	50
REVIDA1A.DNA	1	AATTCCGCTG	TTTGTTCCTC	ATATCATATA	TTGATATCAT	AATTGTTTTG	50
REVIDA12.DNA	1	AATTCCGCTG	TTTGTTCCTC	ATATCATATA	TTGATATCAT	AATTGTTTTG	50
REVIDA10.DNA	1	AATTCCGCTG	TTTGTTCCTC	ATATCATATA	TTGATATCAT	AATTGTTTTG	50
FORIDA1A.DNA	1	AATTCCGCTG	TTTGTTCCTC	ATATCATATA	TTGATATCAT	AATTGTTTTG	50
FORIDA10.DNA	1	AATTCCGCTG	TTTGTTCCTC	ATATCATATA	TTGATATCAT	AATTGTTTTG	50
FORIDA12.DNA	1	AATTCCGCTG	TTTGTTCCTC	ATATCATATA	TTGATATCAT	AATTGTTTTG	50
		60	70	80	90	100	
AFLP1A.DNA	51	TATTATTTAT	TCCTTTGCTT	GTCTATG T	ATTCTACAAG	ACATATGTAG	100
REV781A0.DNA	51	TATTATTTAT	TCCTTTGCTT	GTCTATG T	ATTCTACAAG	ACATATGTAG	100
FOR781A0.DNA	51	TATTATTTAT	TCCTTTGCTT	GTCTATG T	ATTCTACAAG	ACATATGTAG	100
REVIDA1A.DNA	51	TATTATTTAT	TCCTTTGCTT	GTCTATGGT	ATTCTACAAG	ACATATGTAG	100
REVIDA12.DNA	51	TATTATTTAT	TCCTTTGCTT	GTCTATGGT	ATTCTACAAG	ACATATGTAG	100
REVIDA10.DNA	51	TATTATTTAT	TCCTTTGCTT	GTCTATGGT	ATTCTACAAG	ACATATGTAG	100
FORIDA1A.DNA	51	TATTATTTAT	TCCTTTGCTT	GTCTATGGT	ATTCTACAAG	ACATATGTAG	100
FORIDA10.DNA	51	TATTATTTAT	TCCTTTGCTT	GTCTATGGT	ATTCTACAAG	ACATATGTAG	100
FORIDA12.DNA	51	TATTATTTAT	TCCTTTGCTT	GTCTATGGT	ATTCTACAAG	ACATATGTAG	100
		110	120	130	140	150	
AFLP1A.DNA	101	SGTGAAATGA	AGGT.....	.....	.....	.....	150
REV781A0.DNA	101	SGTGAAATGA	AGGT.....	.....	.....	.....	150
FOR781A0.DNA	101	SGTGAAATGA	AGGT.....	.....	.....	.....	150
REVIDA1A.DNA	101	SGTGAAATGA	AGGT.....	.....	.....	.....	150
REVIDA12.DNA	101	SGTGAAATGA	AGGT.....	.....	.....	.....	150
REVIDA10.DNA	101	SGTGAAATGA	AGGT.....	.....	.....	.....	150
FORIDA1A.DNA	101	SGTGAAATGA	AGGT.....	.....	.....	.....	150
FORIDA10.DNA	101	SGTGAAATGA	AGGT.....	.....	.....	.....	150
FORIDA12.DNA	101	SGTGAAATGA	AGGT.....	.....	.....	.....	150

**Abb. 3.6.:** Sequenzunterschiede zwischen Klonen des SCAR-Fragments vom anfälligen Elter 'Idared' (REVIDA1A, REVIDA12, REVIDA10, FORIDA1A, FORIDA10, FORIDA12) und vom resistenten Elter 78/18-4 (REV781A0, FOR781A0) in Vergleich zum Original-AFLP-Fragment (AFLP1A)

Mit Hilfe des Programms 'Oligo Primer Analysis Software, Version 5.0. for Windows' (National Bioscience Inc., Plymouth, UK) wurden neue Primerpaare erstellt, bei denen das 3'-Ende des Reverse-Primers jeweils im Bereich der identifizierten Sequenzunterschiede lag. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, synthetisiert und die optimale Annealingtemperatur mittels Gradienten-PCR ermittelt.

Das Reaktionsgemisch und die Reaktionsbedingungen orientierten sich an den in Kapitel 2.2.3.6. beschriebenen Bedingungen mit individuell modifizierter Annealingtemperatur:

**AU1b-SCAR** (für AFLP1):

die Annealingtemperatur betrug 42°C. Die Primersequenzen waren wie folgt:

AU1b-forward: 5'-CCT GTT TGT TTC TC-3'

AU1b-reverse: 5'-TGT AGA ATA ACA TAG ACT-3'

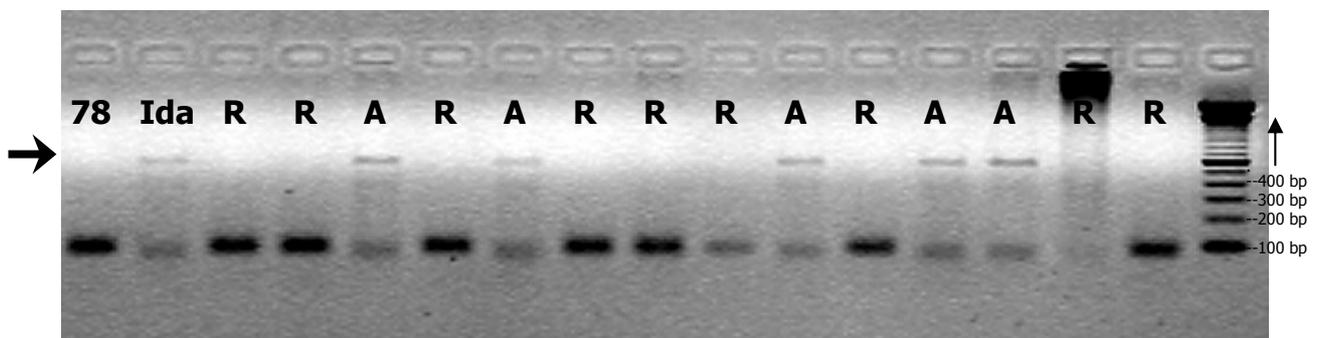
**AU2b-SCAR** (für AFLP2):

Die Annealingtemperatur betrug 55°C. Die Primersequenzen waren wie folgt:

AU2b-forward: 5'-CCA GCC CTC TGA TAA ACC-3'

AU2b-reverse: 5'-ATC GTT ACC AAT GCC ACA-3'

Im Fall von AFLP1 war mit dem SCAR-Marker AU1b eine Unterscheidung von resistenten und anfälligen Genotypen auf Agarosegelen möglich, wie Abb. 3.7. zeigt. Bei resistenten Genotypen wird ausschließlich das Markerfragment im Bereich von 82 bp amplifiziert. Bei anfälligen Genotypen ist hingegen das Markerfragment schwächer amplifiziert und um etwa 10 bp kleiner. Zusätzlich findet man bei anfälligen Genotypen eine weitere Bande im Bereich von 550 bp.



**Abb.3.7.:** Bandenmuster des SCAR-Markers AU1b in einem Ausschnitt der Nachkommenschaft 99/2 (78= resisterer Elter 78/18-4, Ida= anfälliger Elter 'Idared', R= resisterer Sämling aus der Kartierungspopulation 99/2, A= anfälliger Sämling aus der Kartierungspopulation 99/2)

Au1b-SCAR cosegregiert mit AFLP1. Das Amplifikationsprodukt von AU2b-SCAR hingegen war nicht polymorph.

### 3.2.5. CAPS-Marker-Entwicklung

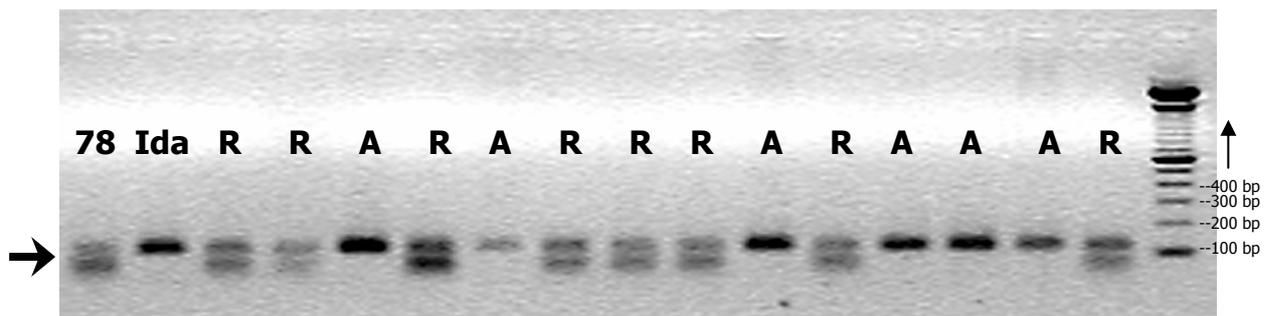
Für die Umwandlung der auf Agarosegelen nicht polymorphen SCAR-Marker in co-dominante CAPS-Marker (cleaved amplified polymorphic sequence; KONIECYN und AUSUBEL, 1993) wurden mit Hilfe des Programms 'DNAsis for Windows 2.1.' (Hitachi Software, San Bruno/Ca., USA) für jeden der beiden ursprünglichen SCAR-Marker

Restriktionsenzyme im Bereich der identifizierten Sequenzunterschiede zwischen den Fragmenten des resistenten und des anfälligen Elters identifiziert:

AU1a SCAR: *Dde* I

AU2a SCAR: *Sec* I, *Bsa* II

Nach Restriktion des Amplifikationsprodukts von AU1a-SCAR mit dem Enzym *Dde*I war eine Unterscheidung von resistenten und anfälligen Pflanzen auf Agarosegelen möglich. Wie Abbildung 3.8. zeigt, weisen anfällige Pflanzen nur die erwartete Bande von 140 bp auf. Bei resistenten Pflanzen hingegen wurde das Fragment des Marker-allels geschnitten, so dass neben der 140 bp-Bande eine weitere Bande im Bereich von 60 bis 80 bp zu erkennen ist, welche wahrscheinlich aus zwei Fragmenten dieses Größenbereichs besteht, die auf Agarosegel aber nicht voneinander abgrenzbar sind. AU1a-CAPS cosegregiert mit AFLP1 unter Berücksichtigung der 158 zur Kartierung verwendeten Genotypen aus der Nachkommenschaft 99/2.



**Abb. 3.8.:** Bandenmuster von AU1a-CAPS für einen Ausschnitt der Nachkommenschaft 99/2 (78= resistenter Elter 78/18-4, Ida= anfälliger Elter 'Idared', R= resistenter Sämling aus der Kartierungspopulation 99/2, A= anfälliger Sämling aus der Kartierungspopulation 99/2)

AU1a-CAPS wurde in einem erweiterten Teil der Nachkommenschaft 99/2, bestehend aus 256 Individuen getestet. Wie in Tabelle 3.7. dargestellt, konnte der Abstand zu  $PI_1$  hier mit 5 cM bestimmt werden, wobei der im Vergleich zu AFLP1 größere Abstand zu  $PI_1$  auf rekombinante Genotypen im neu hinzugenommenen Teil der Nachkommenschaft 99/2 zurückzuführen ist.

**Tabelle 3.7.:** Aufgrund der Rekombinationshäufigkeit berechnete Abstand zu  $PI_1$  für dem Marker AU1a-CAPS

Marker	Anzahl Nachkommen	resistent		anfällig		Rekombination	Abstand zu $PI_1$
		mit Marker	ohne Marker	mit Marker	ohne Marker		
AU1a-CAPS	256	125	7	6	131	5,08%	5 cM

Eine Restriktion des Amplifikationsprodukts von AU2a-SCAR mit dem Enzym *Bsa*II ergab kein auswertbares Ergebnis. Das Enzym *Sec* I war im Fachhandel nicht erhältlich.

### 3.3. Charakterisierung von *Podosphaera leucotricha*

Um die Existenz physiologischer Rassen des Erregers eindeutig zu klären, wurden Einsporisolate des Erregers erstellt und sowohl auf molekularer als auch auf phytopathologischer Basis charakterisiert.

#### 3.3.1. Erstellung von Einsporisolaten

Um langfristig die Kultur von einzelnen *Podosphaera leucotricha*-Isolaten durchführen zu können, musste der Erreger zunächst in Sterilkultur überführt werden. Als Wirtspflanze für den obligat biotrophen Erreger war die bei KRIEGHOFF (1995) als hochanfällig definierte Zierapfelsorte 'Gibb's Golden Gage' ausgewählt worden. Ein Abstreifen der Konidien von angetriebenen Blättern mit Primärbefall, wie es bei KRIEGHOFF (1995) beschrieben wurde, hat sich aber als nicht effektiv herausgestellt, da die Kontamination mit Fremdorganismen bei dieser Methode außerordentlich hoch war. Deshalb wurde schon zu Beginn der Dualkultur die Inokulation steriler Einzelblätter von 'Gibb's Golden Gage' durch Übertragen von Konidien eines einzelnen Konidienträgers als erster Schritt zur Erstellung von Einsporisolaten durchgeführt. In diesem Schritt lag der mittlere Inokulationserfolg bei 39,1 %, wobei auch mit dieser Methode noch durchschnittlich 18,7 % der inokulierten Blätter mit anderen Mikroorganismen kontaminiert waren. Tabelle 3.8. zeigt, dass der Kontaminationsgrad abhängig von der Herkunft des Pflanzenmaterials großen Schwankungen unterliegt. Bei der Erstellung von Einsporisolaten aus Sekundärbefall, wie bei Mehltauherkünften aus Ahrensburg und Dresden-Pillnitz durchgeführt, lag der Anteil kontaminierter Blätter sogar bei 45,4 % mit einem durchschnittlichen Infektionserfolg von 25,2 %.

Aufgrund der oft niedrigen Infektionsrate bei Einzelkonidien-Übertragung hat es sich als sinnvoll erwiesen, in jedem der vier folgenden Subkulturschritte mindestens 20 Einzelblätter mit Konidien aus einer Kolonie zu inokulieren. Als Engpass bei der Erstellung von Einsporisolaten stellte sich die Übertragung der Isolate von Einzelblät-

tern auf Sprosse heraus, wie in Tabelle 3.8. zu erkennen ist. Die Übertragungsrate lag hier bei nur 8,4 %.

**Tabelle 3.8.:** Kontaminationshäufigkeit und Inokulationserfolg bei der Erstellung von Einsporisolate

Herkunft des Inokulums	Befallstyp	Inokulierte Blätter	Kontaminierte Blätter	Infizierte Blätter	Etablierte Einsporisolate
East Malling, GB	Primär	75	22	33	1
East Malling, GB	Primär	38	25	6	1
East Malling, GB	Primär	42	8	19	1
Angers, F	Primär	18	0	7	0
Angers, F	Primär	12	0	5	0
Angers, F	Primär	18	1	6	0
Angers, F	Primär	18	0	2	0
Angers, F	Primär	21	0	4	1
Angers, F	Primär	7	0	4	0
East Malling, GB	Primär	30	25	0	0
Angers, F	Primär	30	0	16	1
Angers, F	Primär	24	0	19	1
Angers, F	Primär	19	5	9	1
Angers, F	Primär	18	3	10	0
Angers, F	Primär	18	0	5	0
Naoussa, G	Primär	24	10	6	1
Naoussa, G	Primär	45	4	17	0
Bologna, I	Primär	32	7	11	0
Bologna, I	Primär	32	4	22	1
Bologna, I	Primär	32	4	11	0
Bennigsen, D	Primär	30	0	16	0
Bennigsen, D	Primär	24	0	8	0
Bennigsen, D	Primär	24	0	11	0
Pillnitz, D	Sekundär	45	20	5	3
Ahrensburg, D	Sekundär	360	164	82	15

Auf *in vitro*-Sprossen etablierte Einsporisolate konnten je nach Bedarf vermehrt werden. Dies war Voraussetzung zur weiteren Charakterisierung der Isolate. Durch die engen Subkulturzeiträume von nur 14 Tagen bei einer Temperatur von +22°C beziehungsweise 40 Tagen bei einer Temperatur von +10°C war die Anzahl parallel kultivierbarer Isolate jedoch beschränkt. Die Länge der Subkultur wurde von zwei Faktoren bestimmt: Zum Einen nahm die Konidienkeimrate mit zunehmendem Alter des Mycels ab und zum Anderen war häufig als Folge des starken Mycelwachstums ein Absterben der infizierten Apfelsprosse zu beobachten. Insgesamt konnten die 27 Isolate der Tabelle 3.9. über die Dauer von drei Jahren erhalten werden. Zusätzlich sind

von dem Einsporisolat ‚Ahr-10‘ (Tabelle 3.9.) vier Einsporisolate erstellt worden, um Aussagen über die genetische Homogenität des Isolats vier Monate nach seiner Erstellung zu erhalten.

**Tabelle 3.9.:** Herkunft von Einsporisolaten von *Podosphaera leucotricha*

Isolat	Herkunft	Ursprünglicher Wirt	Befallstyp
GB 43 K1	East Malling, GB	E 624-43	Primär
GB 43 K2	East Malling, GB	E 624-43	Primär
GB 153	East Malling, GB	E 624-153	Primär
France-T4	Angers, F	‘Golden Delicious‘	Primär
France-T5	Angers, F	‘Golden Delicious‘	Primär
France-T6	Angers, F	‘Golden Delicious‘	Primär
France-T7	Angers, F	‘Golden Delicious‘	Primär
Greece	Naoussa, G	Sämling aus ‘Prima‘ x ‘Gala‘	Primär
Italy	Bologna, I	Coop 16	Primär
Pilln-1	Dresden-Pillnitz, D	‘Priscilla‘	Sekundär
Pilln-2	Dresden-Pillnitz, D	‘Priscilla‘	Sekundär
Pilln-3	Dresden-Pillnitz, D	‘Priscilla‘	Sekundär
Ahr-1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12	Ahrensburg, D	‘Bittenfelder Sämling‘	Sekundär
Ahr-hupA	Ahrensburg, D	<i>M. hupehensis</i> , <i>in vitro</i>	Sekundär
Ahr-hupB	Ahrensburg, D	<i>M. hupehensis</i> , <i>in vitro</i>	Sekundär
Ahr-hupC	Ahrensburg, D	<i>M. hupehensis</i> , <i>in vitro</i>	Sekundär
Ahr-hupD	Ahrensburg, D	<i>M. hupehensis</i> , <i>in vitro</i>	Sekundär
Ahr-G1	Ahrensburg, D	‘Gibb's Golden Gage‘	Sekundär
Ahr-G2	Ahrensburg, D	‘Gibb's Golden Gage‘	Sekundär
Ahr-G4	Ahrensburg, D	‘Gibb's Golden Gage‘	Sekundär
Ahr-A	Ahrensburg, D	89/9-4	Sekundär
Ahr-D	Ahrensburg, D	89/9-4	Sekundär

### 3.3.2. Molekulare Charakterisierung

Da zu Beginn noch kein Protokoll zur DNA-Isolierung von Apfelmehltau vorlag und die verfügbare Menge an Pilzmaterial gering war, wurde der Versuch gemacht, nach dem sogenannten ‘PEX-Protokoll‘ (Kapitel 2.3.3.1.1.) Pilz-DNA aus Mycel und Konidien direkt von der Oberfläche infizierter *in vitro*-Sprosse zu isolieren. Dabei wurde der mit dem Erreger überzogene Spross des Wirts als Ganzes für die DNA-Extraktion verwendet. Da bei dieser Methode DNA ausschließlich aus Zellen der Sprossoberfläche extrahiert wird und diese von Mehltau überzogen war, konnte davon ausgegangen werden, dass ein großer Teil der extrahierten DNA vom Pilz stammte.

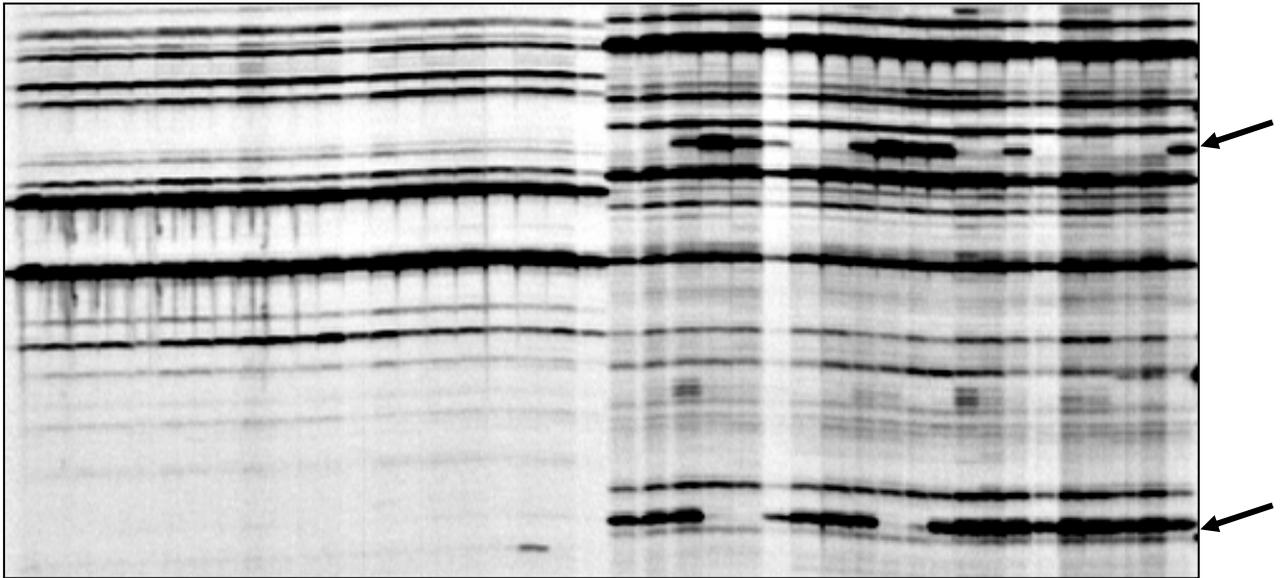
Bei der anschließenden RAPD-Analyse wurde grundsätzlich DNA der Wirtspflanze 'Gibb's Golden Gage' parallel amplifiziert, um sicherzugehen, dass polymorphe Banden auf Pilz-DNA zurückzuführen waren. Der Anteil an Banden, welche auch im Bandenmuster von 'Gibb's Golden Gage' auftraten, stellte sich als hoch heraus. Nur rund 25 % der RAPD-Banden konnten eindeutig *Podosphaera leucotricha* zugeordnet werden. Der Polymorphiegrad der Mehltau-Banden lag bei nur 0,5 % und eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war nur bedingt gegeben.

Als eine effektivere Methode erwies sich das Absaugen von Konidien mittels einer Vakuumblot-Pumpe, wie in Abbildung 3.9. dargestellt, mit anschließender DNA-Isolierung nach dem CTAB-Protokoll (Kapitel 2.3.3.1.2.).



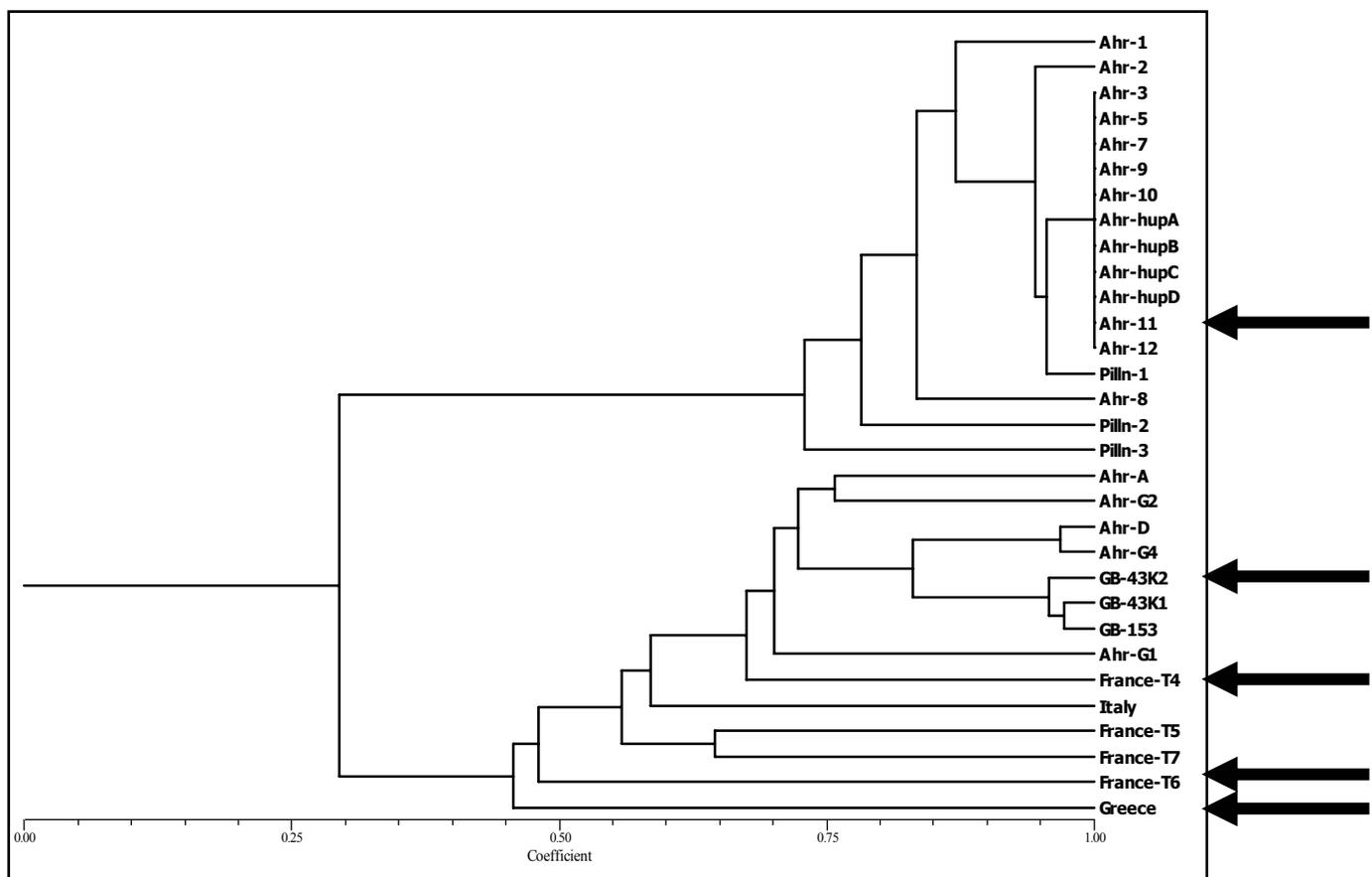
**Abb. 3.9.:** Absaugen von Konidien mittels einer Vakuumblot-Pumpe

Die isolierte DNA stammte ausschließlich vom Pathogen und die Menge und Reinheit derselben ermöglichte die Durchführung einer AFLP-gestützten molekularen Charakterisierung der Isolate. Insgesamt sind 226 AFLP-Primerkombinationen getestet worden. Bei einer durchschnittlichen Zahl von 25 auswertbaren Banden pro Gel konnten 54 stabil reproduzierbare polymorphe Marker identifiziert werden. Zwei von ihnen sind in Abbildung 3.10. dargestellt. Der Polymorphiegrad war mit 0,96 % vergleichsweise niedrig.



**Abb. 3.10.:** Ausschnitt aus einem AFLP-Gel: 21 Einsporisolate mit zwei unterschiedlichen Primerkombinationen. Kombination 1: ohne Polymorphismus  
Kombination 2: mit zwei unabhängig spaltenden Markern

Auf der Basis der Polymorphismen wurde ein Dendrogramm erstellt, welches die genetische Diversität innerhalb der untersuchten Isolate zeigt (Abb. 3.11.).



**Abb. 3.11.:** Dendrogramm der 31 etablierten Einsporisolate. Die mit Pfeil gekennzeichneten Isolate sind für die anschließende phytopathologische Charakterisierung ausgewählt worden

Da nur polymorphe Marker für die Verrechnung des Dendrogramms herangezogen worden sind, der Anteil derselben, gemessen an der Anzahl aller AFLP-Banden, jedoch sehr gering war, ist auch die genetische Variabilität der untersuchten Isolate als sehr niedrig einzustufen. Die Homogenität der Bandenmuster ist in Abbildung 3.10. gut erkennbar.

Das in Abbildung 3.11. aufgeführte Dendrogramm lässt sich in zwei Cluster unterteilen. Das obere Cluster besteht aus den Ahrensburger Isolaten, die von 'Bittenfelder Sämling' isoliert worden waren und den Isolaten aus Dresden-Pillnitz. Die Isolate Ahr-hupA, Ahr-hup, Ahr-hupC und Ahr-hupD sind identisch mit ihrem Ausgangsisolat Ahr-10. Im unteren Cluster befinden sich alle Isolate aus dem europäischen Ausland sowie die fünf Isolate aus Ahrensburg, welche von 'Gibb's Golden Gage' oder 89/8-4 isoliert worden waren. Das untere Cluster zeigt, dass die genetische Distanz zwischen Isolaten aus Ahrensburg und jenen aus dem europäischen Ausland zunimmt, je weiter der Herkunftsort von Ahrensburg entfernt liegt.

Unter der Annahme, dass die beobachtete Variabilität auf DNA-Ebene einen ersten Hinweis auf die Existenz physiologischer Rassen von *Podosphaera leucotricha* darstellt, wurden auf Basis der molekularen Charakterisierung die sechs Isolate Ahr-11, France-T4, France-T6, Italy, Greece und GB-43 K2 ausgewählt, welche einen Querschnitt der genetischen Variabilität innerhalb der vorliegenden Isolate repräsentierten. Sie wurden in einer anschließenden phytopathologischen Charakterisierung hinsichtlich ihrer Eigenständigkeit als physiologische Rasse geprüft.

### 3.3.3. Phytopathologische Charakterisierung

Verschiedene Möglichkeiten zur phytopathologischen Charakterisierung der sechs ausgewählten Isolate sind hinsichtlich ihrer Eignung als effektiver, einfach durchführbarer Inokulationstest zur Simulation von Freilandbefall getestet worden.

Eine Inokulation von *in vitro*-Sprossen, wie sie von SCHEEWE (1990) und KRIEGHOFF (1995) durchgeführt worden ist, hat sich in Bezug auf diese Fragestellung als nicht sinnvoll herausgestellt. In einem Versuch mit sechs Apfelgenotypen unterschiedlichen Resistenzgrades, nämlich 'Gibb's Golden Gage' (sehr anfällig), 'Durello di

Forli' (anfällig), 'Laxton's Superb' (anfällig), *Malus zumi* 274 (resistent, Pl<sub>2</sub>), 78/18-4 (resistent, Pl<sub>1</sub>), und *Malus hupehensis* (resistent), konnte auch bei den als resistent geltenden Wildarten eine Woche nach Inokulation mit Einsporisolaten deutlich sporulierender Befall festgestellt werden. In den Inokulationsversuchen mit Einzelblättern wurde gezeigt, daß das Isolat Ahr-11, genetisch identisch mit Ahr-B10, wie Abbildung 3.11. zeigt, nicht in der Lage ist, *Malus hupehensis* zu infizieren (Kapitel 7.4.), jedoch sind die Isolate Ahr-hupA, Ahr-hupB, Ahr-hupC und Ahr-hupD von dem Isolat Ahr-B10 zu dem Zeitpunkt isoliert worden, als dieses auf *in vitro*-Sprossen von *Malus hupehensis* kultiviert wurde (Tabelle 3.9.).

Neben der fehlenden Reproduzierbarkeit von Freilandergebnissen ist auch die mit dieser Testmethode verbundene Etablierung von vielen verschiedenen Apfelgenotypen *in vitro* kaum realisierbar.

Als zweite Methode wurde eine Inokulation von angetriebenen Trieben (Kapitel 2.3.4.3.) durchgeführt. In Abbildung 3.12. ist ein Beispiel hierfür abgebildet. Die erhaltenen Infektionsdaten in Tabelle 3.10. stimmten weitgehend mit dem erwarteten Ergebnis, dargestellt in Kapitel 7.1., überein. Es hat sich jedoch als Nachteil herausgestellt, dass bei der Methode auf angetriebene Apfelreiser zurückgegriffen werden muss, denn der Zeitraum, in dem diese verfügbar sind, ist auf das Frühjahr beschränkt. Deshalb sind Versuche durchgeführt worden, um diesen Zeitraum zu verlängern. Es war möglich, einjährige Triebe nach dem Triebabschluss im



**Abb.3.12:** Angetriebene Zweige dreier exemplarischer Sorten zwei Wochen nach Inokulation mit dem Einsporisolat 'Ahr-11'

Spätsommer entblättert und in feuchten Sand gesteckt im Kühlraum einzulagern, so dass das Kältebedürfnis bereits im Dezember befriedigt war. Ebenso war es möglich, auf diese Weise im Winter geschnittenen Reiser bis in den Sommer hinein einzulagern und nach Bedarf anzutreiben. Die Qualität des Austriebs nahm hier jedoch mit

zunehmender Lagerzeit deutlich ab. Limitierend bei dieser Methode war die Verfügbarkeit von Reisermaterial und der hohe Platzbedarf in Kulturräumen. Es ist zusätzlich der Versuch unternommen worden, während der Vegetationszeit im Wachstum befindliche Triebe für Inokulationsversuche zu schneiden, jedoch sind die jungen Triebspitzen als wichtigster potentieller Infektionsort nach dem Transfer in das Glasgefäß häufig vertrocknet.

Als besonders effektive Methode zur phytopathologischen Charakterisierung der Isolate hat sich die Inokulation von Einzelblättern mit Hilfe eines Inokulationsturms herausgestellt (Kapitel 2.3.4.4.). Tabelle 3.10. zeigt, dass die Ergebnisse genauer sind als jene, die mit der Inokulation angetriebener Triebe erhalten worden sind. Beispielsweise konnte die Sorte 'Alkmene', welche bei den Triebinokulationen mit dem Isolat 'Greece' befallsfrei geblieben war, bei den anschließend durchgeführten Blattinokulationen als anfällig für das Isolat identifiziert werden.

**Tabelle 3.10.:** Vergleich der Ergebnisse von Spross- und Blattinokulation in einem Ausschnitt des *Malus*-Testsortiments

Genotyp	Isolat 'Ahr-11'		Isolat 'Greece'	
	Sprossinokulation	Blattinokulation	Sprossinokulation	Blattinokulation
'Alkmene'	+	+	-	+
'Carola'	-	-	+	+
'Danziger Kant'	+	+	+	+
'Gibb's Golden Gage'	+	+	+	+
'Tydeman's Late O.'	+	+	+	+
'Jonathan'	+	+	+	+
'Laxton's Superb'	-	-	-	-
TN 10-8	+	+	-	+
'Roter Berlepsch'	-	+	+	+
'Stirling Castle'	-	-	-	+
<i>M. hupehensis</i> (E334-62)	-	-	-	-
D12 (Original)	-	-	-	-
'White Angel' (E295-4)	-	-	-	-
'White Angel' (89/9-4)	+	-	+	-

Entgegen der beispielsweise an Süßkirschen praktizierten Methode (OLMSTEAD et al., 2001a, 2001b, und 2001c), bei der vor der Inokulation die Blattoberfläche mit Ethanol sterilisiert wird, wurden die Blätter ohne jede vorherige Oberflächenbehand-

lung verwendet. Es sind Versuche zur Oberflächensterilisation sowohl mit Ethanol als auch mit Natriumhypochlorid in verschiedener Konzentration durchgeführt worden. Dabei konnten häufig Blattverbräunungen als Folge von kleinen Verletzungen der Blattoberfläche im Sterilisationsprozess beobachtet werden (Abb. 3.12.). Eine negative Folgeerscheinung der Oberflächensterilisation war das Auftreten von Mehltaubefall auf Blättern, die nicht inokuliert worden waren (Abb. 3.13.).



**Abb. 3.12.:** Blattverbräunung als Folge von Oberflächensterilisation bei *Malus robusta persicifolia*



**Abb. 3.13.:** Mehltaubefall ohne Inokulation an einem Blatt der Sorte 'Roter Berlepsch' 12 Tage nach Oberflächensterilisation mit 70 %igem Ethanol

Bei einer Verwendung der Blätter ohne vorherige Oberflächenbehandlung dagegen waren nur selten Blattverbräunungen zu beobachten. Die Verwendung von Benzimidazol-Agar (Kapitel 2.3.4.4.) war zur Unterdrückung des Wachstums unerwünschter Mikroorganismen auf dem Nährmedium ausreichend.

Eine Inokulation von ausgestanzten Blattscheiben, wie sie bei OLMSTEAD et al. (2001a, 2001b und 2001c), GIEFFERS (1999), CELIO und HAUSBECK (1998) oder HOSOYA et al. (1999) durchgeführt wurde, hat sich, ebenfalls wegen der durch die Verletzung ausgelösten Blattverbräunung, für Apfelblätter als nicht praktikabel herausgestellt.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, sind bei den Inokulationsversuchen mindestens drei Wiederholungen pro Einsporisolat angestrebt worden. Dabei wurde ein Apfelgenotyp auch dann als anfällig für ein Isolat eingestuft, wenn er nur ein einziges Mal infiziert wurde. Da nicht immer Blattmaterial im richtigen Entwicklungsstadium

verfügbar war, war die Anzahl der inokulierten Apfelgenotypen zwischen den einzelnen Wiederholungen zum Teil verschieden.



**Abb. 3.14.:**

Inokulationserfolg auf zwei Blättern der Sorte 'Gibb's Golden Gage' 10 Tage nach Inokulation in Abhängigkeit vom Blattalter. Das ältere Blatt links blieb infektiionsfrei.

Einzelheiten zu den Inokulationsversuchen sind in Kapitel 7.4. dargestellt.

Als entscheidend für den Inokulationserfolg erwies sich das Entwicklungsstadium der in den Inokulationsversuchen verwendeten Blättern. Nur sehr junge, noch im Wachstum befindliche Blätter waren geeignet. Selbst bei sehr anfälligen Genotypen wie bei der in Abbildung 3.14. abgebildeten Sorte 'Gibbs Golden Gage' blieben ausgewachsene Blätter infektiionsfrei.

Als Ergebnis der Inokulationsversuche ist das in Tabelle 3.11. aufgeführte Apfel-

Differentialsortiment, bestehend aus sieben *Malus*-Genotypen, erstellt worden, welches eine Unterscheidung von fünf der sechs Isolate auf der Basis ihres Infektionsverhaltens ermöglicht.

**Tabelle 3.11.:** Malus-Differentialsortiment zur Unterscheidung von fünf Einsporisolaten

		Isolate				
		Ahr-11	F-T6	GB-K2	Italy	Greece
<i>Malus</i> -Genotyp	'Gibb's Golden Gage'	+	+	+	+	+
	'Prima'	-	+	+	+	+
	'Stirling Castle'	-	-	-	-	+
	'Discovery'	-	-	-	+	-
	<i>M.hupehesis</i> (Pi)	-	-	+	-	-
	'Worcester'	-	+	-	-	-
	D12	-	-	-	-	-

Da alle fünf Isolate ein eigenes Wirtsspektrum aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hier um unterschiedliche physiologische Rassen des Erregers handelt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Selektion neuer Mehltaresistenzquellen

Die Erweiterung der genetischen Vielfalt, mit besonderer Berücksichtigung von Resistenz, ist ein wichtiges Ziel in der Apfelmehrzüchtung. FISCHER (1994a) bezeichnet einen "mannigfaltigen Genpool" als Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Züchtung resistenter Apfelsorten. Die genetische Vielfalt im aktuellen Apfel-Sortenspektrum ist jedoch nur sehr eingeschränkt (WAY et al., 1990, ORAGUZIE et al., 2001a und 2001b). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen potentielle Resistenzquellen für echten Mehltau in ihrer Resistenz genauer charakterisiert werden um den für die Züchtung zur Verfügung stehenden Genpool zu erweitern. Aus diesem Grund ist ein Testsortiment, bestehend aus 20 zumeist alten Kultursorten mit bekannt geringer Anfälligkeit für den Erreger, neun als resistent geltenden Wildarten oder deren Derivaten, fünf schorfresistenten Sorten und zwei anfälligen Kontrollsorten (Kapitel 7.1.), an fünf verschiedenen Standorten innerhalb Europas aufgepflanzt worden.

Besonders im Bereich der "alten" Kultursorten werden einige Genotypen mit großer Widerstandsfähigkeit gegenüber *Podosphaera leucotricha* vermutet, deren Vererbung im allgemeinen polygener Natur ist (MIHATSCH und MILDENBERGER, 1966a; ALSTON, 1969; LESPINASSE et al., 1976; FISCHER, 1994a; KRÜGER, 1995). Sie wurden im *Malus* - Testsortiment deshalb besonders berücksichtigt.

Die Genotypen 'Dülmener Rosenapfel' und 'Rote Sternrenette' sind als einzige Sorten des Testsortiments in allen drei Befallerfassungsjahren weitgehend befallsfrei geblieben (Tabelle 3.2.). Sie werden schon von anderen Autoren als sehr widerstandsfähig hervorgehoben (MIHATSCH und MILDENBERGER, 1966a; FISCHER, 1994a; KRÜGER, 1995). Beide Sorten geben ihre Resistenz entsprechend einer Normalverteilung weiter (MIHATSCH und MILDENBERGER, 1966a), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Mehltaresistenz dieser Sorten polygen bedingt ist. Beide sind als Resistenzdonoren für zukünftige Zuchtprogramme zu empfehlen, da sie als Tafeläpfel zusätzlich zu ihrer polygen bedingten Mehltaresistenz bereits wertvolle Fruchteigenschaften in den Zuchtprozess einbringen.

Neun weitere Kultursorten ('Democrat', 'Lord Lambourne', 'Pi-As-22/17', 'Melba', 'Peasgood's Nonesuch', 'Roter Berlepsch', 'Stirling Castle', 'Maiden's Blush' und 'Glockenapfel') konnten als "feldresistent" eingestuft werden (Tabelle 3.2.) Diese Geno-

typen wiesen zum Teil leichten Befall auf. Da Echter Mehltau im Allgemeinen nicht fruchtschädigend ist (FRIEDRICH und RODE, 1996), kann ein gewisser Befall toleriert werden. Feldresistenz wird deshalb im Bezug auf den Echten Mehltau als ausreichendes Zuchtziel betrachtet (FISCHER et al., 1994; MEHLENBACHER, 1995). Besonders im Hinblick auf die Kombination verschiedener Mehltaresistenzen kann das Einkreuzen quantitativer Resistenzen aus feldresistenten Sorten ein schnelles Überwinden der Gesamtresistenz verhindern. Auch die als "feldresistent" eingestuften Apfelsorten kommen daher als Kreuzungspartner im Rahmen einer Züchtung auf Resistenz gegen *Podosphaera leucotricha* in Frage.

Unter den schorfresistenten Sorten sind ebenfalls Genotypen mit einem hohen Grad an Widerstandsfähigkeit gegenüber Echtem Mehltau bekannt, welches auf an der Schorfresistenz beteiligte Minorgene zurückgeführt wird, die universell antifungal zu wirken scheinen (KPÜGER, 1991; FISCHER, 1994c; JANSE et al., 1994; KORBAN und RIEMER, 1996). Die schorfresistente Sorte 'Discovery' hat sich bei der Befallsbewertung des Testsortiments als sehr widerstandsfähig gegen *Podosphaera leucotricha* herausgestellt (Tabelle 3.1.). In der QTL-Kartierung einer Nachkommenschaft aus 'Discovery' x 'Prima' (THIERMANN et al., 2002) konnten auf der Karte von 'Discovery' mehrere Genombereiche mit starken QTL-Effekten für Mehltaresistenz identifiziert werden. Dies bedeutet, dass es sich bei dieser Sorte um einen Genotyp handelt, der neben Schorfresistenz eine starke polygen bedingte Mehltaresistenz besitzt. Wegen ihrer polygen bedingten Resistenz für zwei der wichtigsten pilzlichen Pathogene im Apfelanbau und den zusätzlich positiven Fruchteigenschaften ist diese Sorte als Kreuzungspartner im Rahmen einer Resistenzzüchtung sehr zu empfehlen.

Die Resistenz von Wildarten ist im Gegensatz zu der Widerstandsfähigkeit der Kultursorten in vielen Fällen auf einzelne Majorgene zurückzuführen (KNIGHT und ALSTON, 1968; DAYTON, 1977; GALLOT et al., 1985; HEMMAT et al., 1994). Eine Beteiligung von modifizierenden Minorgenen ist jedoch sehr wahrscheinlich (ALSTON, 1983; KRÜGER, 1994; BATLLE und ALSTON, 1996). In der Stärke ihrer Resistenz sind die Wildarten den Kultursorten im Allgemeinen überlegen (KNIGHT und ALSTON, 1968; FISCHER et al., 1984), jedoch ist die Gefahr des "Brechens" solcher Resistenzen durch neue Pathotypen des Erregers wegen der geringen Zahl beteiligter Gene weit aus höher.

Wie erwartet blieben die meisten Wildarten und Wildartderivate des *Malus*- Testsortiments am Standort Ahrensburg in allen drei Jahren ohne Mehltaubefall (Tabelle 3.1.). Von dieser Erwartung abweichend war allerdings bei *Malus zumi calocarpa* und dem 'White Angel'-Sämling 89/9-4 Befall festgestellt worden. Bei 89/9-4 kann davon ausgegangen werden, dass der Genotyp nicht Träger der  $Pl_w$ -Resistenz ist, denn bei molekularen Untersuchungen wurde ein eng gekoppeltes Markerfragment nicht amplifiziert (C. JAMES, pers. Mitteilung). Dieser Umstand war bisher nicht bemerkt worden, da der aus einer freien Abblüte von 'White Angel' stammende Sämling 89/9-4 am ursprünglichen Standort Ahrensburg unter dem dortigen geringen Infektionsdruck im Freiland befallsfrei geblieben war. Erst die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Prüfung unter optimierten Befallsbedingungen im Folientunnel zeigte seine Anfälligkeit.

Der im Testsortiment verwendete *Malus zumi calocarpa* ist nicht der Genotyp, für den die  $Pl_2$ -Resistenz ursprünglich beschrieben worden war. Es handelt sich vielmehr um einen Wildtyp aus der *Malus*-Genbank in Dresden-Pillnitz, welcher am Institut für Obstzüchtung in Dresden-Pillnitz in der Resistenzzüchtung eingesetzt wird. In der molekularen Untersuchung mit dem  $Pl_2$ -SCAR-Marker N18 (SEGLIAS-HODEL, 1997) wurde das erwartete Markerfragment nicht amplifiziert. An den anderen Standorten des Testsortiments blieb der Genotyp jedoch befallsfrei (Kapitel 7.1.2.). Da der Befall nur im ersten Jahr der Befallserfassung aufgetreten war, kann es sich auch um eine Form von juveniler Anfälligkeit handeln, die für junge Apfelsämlinge häufig beschrieben wird (MIHATSCH und MILDENBERGER, 1967; JANSE et al. 1994).

Alle als resistent eingestuften Wildarten und deren Derivate sind prinzipiell als Resistenzdonoren in der Apfzüchtung geeignet. Dabei sollte aber beachtet werden, dass die Resistenz der im Testsortiment charakterisierten Genotypen meist monogen bedingt ist. Um eine schnelle Überwindung dieser Resistenzen durch neue Rassen des Erregers zu vermeiden, sollte deshalb eine Akkumulation verschiedener Resistenzen in einem Genotyp, auch als "Pyramidisieren" von Resistenzgenen bezeichnet, angestrebt werden.

Die Umweltabhängigkeit der Mehltaubresistenzausprägung ist ein vieldiskutiertes Problem (MIHATSCH und MILDENBERGER, 1966b; LESPINASSE et al., 1976; SCHÜEPP et al., 1987; FISCHER, 1994a; Fischer et al., 1994). Laut SCHANDER (1958) ist

der Befall von Apfelgenotypen mit Echtem Mehltau an einem Standort abhängig von der allgemeinen Witterung vor Ort, dem Nährstoffstatus des Genotypen, der verwendeten Unterlage, dem Laubalter zum Zeitpunkt der Infektion und einem potentiellen Rassenspektrum des Erregers. MIHATSCH und MILDENBERGER (1966b) postulieren deshalb, dass die Resistenz eines Apfelgenotypen grundsätzlich nur für den jeweils untersuchten Standort definiert werden kann. KELLERHALS und FURRER (1994) sind zu der Erkenntnis gekommen, dass sichere Aussagen über den Resistenzgrad eines Genotypen erst gemacht werden können, wenn mehrere Jahre an mehreren Standorten geprüft wird.

Die Befallserfassung des *Malus* - Testsortiments an verschiedenen Standorten innerhalb Europas zeigt, dass die Ergebnisse der einzelnen Standorte durchaus vergleichbar sind (Kapitel 7.1.2.): Die Resistenz der Wildarten und Wildartderivate ist an allen Standorten gegeben und auch 'Dülmener Rosenapfel', 'Rote Sternrenette' und 'Discovery' zeigen unabhängig vom Standort keinen bzw. nur sehr geringen Befall. Diese Genotypen sind also nicht nur lokal von Bedeutung, sondern können überregional für die Züchtung empfohlen werden.

#### **4.2. Kartierung des Resistenzgens $PI_1$**

Die Selektion weiterer polygen bedingter Resistenzquellen ist nur ein Meilenstein auf dem Weg zur dauerhaft mehlttauresistenten Apfelsorte. Auch die gezielte Akkumulation verschiedener monogen bedingter Resistenzen in einem Genotyp vermindert die Gefahr der Überwindung der Resistenz durch den Erreger. Dieses "Pyramidisieren" von verschiedenen Resistenzgenen ist nur mit Hilfe eng gekoppelter molekularer Marker möglich (GESSLER und BLAISE, 1994; KELLERHALS und FURRER, 1994; KELLY, 1995; ADAM und SOMERVILLE, 1996; KNAPP, 1998). Die Entwicklung solcher Marker ist somit eine Grundvoraussetzung zur Steigerung der Effizienz von zukünftigen Resistenzzuchtprogrammen. Im Bezug auf das Mehlttauresistenzgen  $PI_1$  aus *Malus robusta* stand zu Beginn dieser Arbeit bereits der SCAR-Marker AT20-450 (MARKUSSEN, 1996) zur Verfügung. Da der Marker jedoch in unterschiedlichem genetischen Hintergrund nicht immer entsprechend der Merkmalsausprägung 'Mehlttauresistenz' spaltet (URBANIETZ et al., 1998; KELLERHALS et al., 2000; BUS et al., 2000)

sollten weitere, enger an  $Pl_1$  gekoppelte molekulare Marker mit Hilfe einer AFLP-gestützten "Bulked-Segregant-Analyse" identifiziert werden.

Zur Identifizierung von eng an das Zielgen gekoppelten molekularen Markern ist in der Regel eine möglichst große spaltende Nachkommenschaft notwendig. Da eine solche zu Beginn dieser Arbeit nicht vorhanden war, wurde die Kartierungspopulation 99/2 durch eine Kreuzung von der anfälligen Kultursorte 'Idared' mit dem resistenten Zuchtklon 78/18-4 erstellt. Abbildung 2.1. zeigte, dass die Mehltaresistenz von 78/18-4 aus einem der von KNIGHT und ALSTON (1968) als Träger der  $Pl_1$ -Resistenz definierten Zuchtklone stammt. Die Befallserfassung ist visuell anhand eines Boniturschemas vorgenommen worden. OLMSTEAD et al. (2001b) haben verschiedene Formen der Befallserfassung im Bezug auf den echten Mehltau an Süßkirschen miteinander verglichen. Das Ergebnis einer visuellen Befallserfassung ist dabei nicht signifikant von anderen Formen der Befallserfassung abgewichen, war aber schneller und weniger arbeitsaufwendig. Auch PAUQUET et al. (2001) befanden eine visuelle Befallsbewertung als ausreichend für die Kartierung eines Mehltaresistenzgens bei Weinreben. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass eine visuelle Befallserfassung auch für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ausreichend war.

Die Identifizierung eng an das Zielgen gekoppelter molekularer Marker mit Hilfe der AFLP-Technik wurde bereits bei zahlreichen Kulturpflanzen beschrieben (z. B. THOMAS et al., 1995; NEGI et al., 2000; XU und KORBAN, 2000; PAUQUET et al., 2001). Durch die Testung von 540 AFLP-Primerkombinationen in der "Bulked-Segregant-Analyse" konnten fünf Marker mit offensichtlicher Kopplung an das Mehltaresistenzgen  $Pl_1$  identifiziert werden, jedoch nur zwei waren enger an das Zielgen gekoppelt als der SCAR-Marker AT20-450.

Ursache hierfür könnte eine gewisse Ungenauigkeit in der Befallserfassung sein: Die Auswahl der Genotypen für die "Bulked-Segregant-Analyse" erfolgte wegen des zeitlichen Rahmens dieser Arbeit aufgrund der Befallserfassung im Folientunnel während des Aussaatjahrs. Die Aussagefähigkeit einer solchen Frühselektion ist jedoch umstritten (SCHANDER, 1958; MIHATSCH und MILDENBERGER, 1967; VISSER und VERHAEGH, 1979; ALSTON, 1983; KORBAN und DAYTON, 1983; GOONEWARDENE et al., 1986; KORBAN und RIEMER, 1990; KELLERHALS und FURRER, 1994; JANSE et al., 1994; MEHLENBACHER, 1995). Während einige Autoren (SCHANDER, 1958; ALSTON, 1983; MEHLENBACHER, 1995) eine Selektion im Sämlingsstadium während

der Gewächshausphase für möglich halten, lehnen andere (MIHATSCH und MILDENBERGER, 1967; KORBAN und DAYTON, 1983; JANSE et al., 1994; KELLERHALS und FURRER, 1994) dies grundsätzlich ab. Sie befürworten die Auswertung eines mehrjährigen Befallsmittels im Freiland als maßgebend für die Definition des Resistenzstatus' eines Genotyps. Wegen des witterungsbedingt geringen Befallsdrucks im Freiland von Ahrensburg würde das für die vorliegende Arbeit, abgesehen vom Zeitfaktor, vermutlich aber keine verlässlicheren Daten erbracht haben. KORBAN und RIEMER (1990) sind der Auffassung, dass der Infektionsdruck im Gewächshaus generell zu stark sei. Mit der vorliegenden Arbeit konnte dies jedoch nicht bestätigt werden, denn erst im dritten Standjahr hatte sich ein Befallsdruck aufgebaut, der die erwartete 1:1-Spaltung für ein monogen dominantes Merkmal auch phänotypisch erkennbar machte (Tabelle 3.3.).

GOONEWARDENE et al. (1986) beobachteten Unterschiede im Befallsbild zwischen Gewächshaus und Freiland. VISSER und VERHAEGH (1979) postulierten sogar die Präsenz von zwei Genen: Eines soll unter Gewächshausbedingungen wirken, während das zweite im Freiland Resistenz bewirken soll. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit geschaffenen optimalen Infektionsbedingungen in einem offenen Folientunnel kombinierten die Gegebenheiten von Gewächshaus und Freiland. Der Zusammenhang zwischen Markerpräsenz und Resistenz war besonders eindeutig, wenn der durchschnittliche Befall aller drei Erfassungsjahre als Grundlage für die ResistenzEinstufung zur Kartierung angenommen wurde (Tabelle 3.5.). Damit konnte bestätigt werden, dass eine Frühselektion  $Pl_1$ -resistenter Genotypen prinzipiell zwar möglich ist, die Bewertung mehrerer Befallsjahre aber eindeutigere Ergebnisse liefert. Für die Erstellung der molekularen Karte sind deshalb nur Genotypen eingesetzt worden, die in allen drei Jahren eindeutig einem Resistenzstatus zugeordnet werden konnten.

Eine weitergehende Bewertung der Resistenz der Nachkommenschaft 99/2 unter Freilandbedingungen wird erst nach Abschluss der vorliegenden Arbeit am Institut für Obstzüchtung in Dresden-Pillnitz erfolgen.

Im Rahmen der "Narrow-Down-Bulked-Segregant-Analyse" wurde angestrebt, durch eine gezielte Auswahl von rekombinanten Genotypen zur Erstellung der Bulks weitere Marker zu identifizieren, die enger an  $Pl_1$  gekoppelt sind als AFLP1 und AFLP2. Der Test von 260 zusätzlichen AFLP-Primerkombinationen ergab zwar zwei zusätzliche Marker für  $Pl_1$ , jedoch konnten beide nicht näher am Zielgen lokalisiert werden. Ein

wichtiges Ergebnis war jedoch die Identifizierung von AFLP6, denn durch diesen Marker liegt nun ein flankierender Marker für  $Pl_1$  vor. Alle bis dahin identifizierten Marker waren aufgrund gleicher Rekombinationsereignisse zusammen auf der selben Seite des Gens lokalisiert worden. Deshalb wurde zunächst vermutet, dass  $Pl_1$  am Ende eines Chromosoms liegen könnte. Der relativ große Abstand von AFLP6 zum Genort könnte darauf hindeuten, dass  $Pl_1$  auf dem Chromosom in der Nähe des Centromers lokalisiert ist. Dies wäre auch eine Erklärung dafür, dass die Identifizierung von Markern im Intervall zwischen AFLP2 und  $Pl_1$  bisher ergebnislos blieb.

Ein Faktor, der generell die klare Eingruppierung von Sämlingen einer spaltenden Nachkommenschaft in resistent und anfällig erschwert, ist die Rolle von modifizierenden Minorgenen. Sie verhindern eine klare ja-nein-Reaktion im Bezug auf die Ausprägung von Resistenz. Dies ist wahrscheinlich auch ein Grund dafür, dass selbst nach drei Befallserfassungsjahren nicht alle Sämlinge der Nachkommenschaft 99/2 eindeutig einem Resistenzstatus zugeordnet werden konnten. Kapitel 7.5. zeigt, dass alle Übergänge von völlig befallsfrei bis sehr stark befallen in der Nachkommenschaft vorkommen. KRÜGER (1994, 1995) sah den Verlust von Minorgenen im Verlauf der mehrfachen Rückkreuzung mit Kultursorten als einen Grund dafür, dass die Stärke der Resistenz von  $Pl_1$  nachlassen kann und dass in Nachkommenschaften, die für diese Resistenz spalten, keine eindeutige 1:1-Spaltung in resistente und anfällige Pflanzen vorliegt. Auch GALLOT et al. (1985) betrachten den Grund für Abweichungen vom erwarteten Spaltungsverhältnis bei  $Pl_1$ -Kreuzungen in der Beteiligung von modifizierenden Minorgenen. KRÜGER (1995) unterstreicht die Rolle, die dem Kreuzungspartner als Donor von potentiell resistenzunterstützenden Minorgenen zukommt.

Die Abhängigkeit monogen vererbter Resistenzen von resistenzunterstützenden Minorgenen wird verdeutlicht am Beispiel der Schorfresistenz  $V_f$  aus *Malus floribunda* 821 (PARISI et al., 1993): Die Schorf rasse 6 ist in der Lage, die  $V_f$ -Resistenz in *Malus floribunda*-Nachkommen zu überwinden, nicht jedoch die Resistenz von *Malus floribunda* 821 selbst. PARISI et al. (1993) beschreiben ein häufiges Abweichen von der erwarteten 1:1-Spaltung in Nachkommenschaften, die für  $V_f$  spalten. DUREL et al. (2002) demonstrierten, dass in einer Nachkommenschaft der  $V_f$ -resistenten Sorte 'Prima' (anfällig für die Schorf rasse 6), welche mit der leicht anfälligen Sorte 'Fiesta'

gekreuzt wurde, Sämlinge vorkommen, die gegenüber der Schorfrasse 6 resistent sind. Die Bedeutung von Minorgenen bei der Vererbung von  $V_f$  wird auch von DURHAM und KORBAN (1994) diskutiert.

Eine Abweichung von der erwarteten 1:1-Spaltung in resistente und anfällige Sämlinge in  $PI_1$ -Nachkommenschaften, wie sie auch in den ersten beiden Befallserfassungsjahren in der Nachkommenschaft 99/2 aufgetreten ist (Tabelle 3.3.), wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben (ALSTON, 1976; FISCHER, 1994a, 1994b, 1994c; KNIGHT und ALSTON, 1968; OGNJANOV und VUJANIC-VARGA, 1988). Ähnlich wie bei  $V_f$  könnte diese Abweichung in der Nachkommenschaft 99/2 auf Minorgene zurückzuführen sein, die unter dem starken Infektionsdruck im dritten Befallserfassungsjahr aber nicht mehr wirksam waren.

Die Möglichkeit der Beteiligung von mehr als einem Gen an der  $PI_1$ -Resistenz ist schon mehrfach diskutiert worden (ALSTON, 1976; VISSER und VERHAEGH, 1979; FISCHER, 1994 a, 1994b, 1994c; KRÜGER, 1994, 1995). KELLERHALS et al. (2000) und BUS et al. (2000) stellten in ihren Versuchen zur markergestützten Selektion fest, dass der SCAR-Marker AT20-450 in ihren Nachkommenschaften nicht entsprechend der Befallsausprägung spaltet. In der Nachkommenschaft 99/2, die auf den selben Resistenzdonor (A142/5) zurückgeht wie die von MARKUSSEN (1996) zur Identifizierung von AT20-450 verwendete Nachkommenschaft 93/9, konnte jedoch erneut ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Marker und der Resistenzausprägung festgestellt werden. Wie die Abb. 2.1. zeigt, wurden an verschiedenen Apfelzuchtstationen jeweils unterschiedliche Nachkommen des *Malus robusta*-Klons, für den die  $PI_1$ -Resistenz ursprünglich beschrieben worden war, zur Erstellung der für  $PI_1$  spaltenden Nachkommenschaften verwendet. Der Marker spaltet in den aus Ahrensburg stammenden Nachkommenschaften entsprechend der Merkmalsausprägung. An anderen Standorten jedoch, an denen Geschwister des in Ahrensburg verwendeten Zuchtklons A 142/4 als Grundlage zur Züchtung  $PI_1$ -resistenter Nachkommenschaften eingesetzt worden waren, lieferte er kein befriedigendes Ergebnis (KELLERHALS et al., 2000). Dies deutet darauf hin, dass noch weitere Gene an der  $PI_1$ -Resistenz beteiligt sein müssen, die nicht an die Präsenz des SCAR-Markers AT20-450 gekoppelt sind. DUNEMANN (persönliche Mitteilung) griff die Hypothese von ALSTON (1976) auf, dass zwei Gene an der  $PI_1$ -Resistenz beteiligt sind. Eines der beiden kann mit dem SCAR-Marker AT20-450 identifiziert werden, während das zweite, welches er mit

$Pl_x$  bezeichnet, nicht mit dem Marker cosegregiert. Resistenz wird in einem Individuum nur dann ausgeprägt, wenn beide Gene mit mindestens einem dominanten Allel vorkommen. DUNEMANN (persönliche Mitteilung) geht davon aus, dass am Standort Ahrensburg nur das 'Hauptgen' ( $Pl_1$ ) in den Nachkommenschaften spaltet, während an anderen Standorten beide Gene für die Merkmalsausprägung von Bedeutung sind. Wenn in '78/18-4' das Gen  $Pl_x$  im homozygot dominanten Zustand vorliegen würde, käme es in allen Sämlingen der Nachkommenschaften zur Merkmalsausprägung und das Gen wäre für die Kartierung von  $Pl_1$  nicht relevant. An anderen Standorten könnte  $Pl_x$  im resistenten Elter jedoch heterozygot vorliegen. Ein Viertel der Sämlinge trügen dann den Marker, wären aber anfällig. Die Überprüfung dieser Hypothese in einer spaltenden Nachkommenschaft steht noch aus. Erste Tests mit dem im Rahmen dieser Arbeit identifizierten CAPS-Marker 'AU1a-CAPS' in East Malling (C. JAMES, persönliche Mitteilung) deuten darauf hin, dass diese Hypothese zutreffend sein könnte.

Aussagen darüber, wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Marker in der gesamten Nachkommenschaft 99/2 spalten, können bisher noch nicht gemacht werden, weil nicht alle Sämlinge in den drei Befallserfassungsjahren einem eindeutigen Resistenzstatus zugeordnet werden konnten.

### **4.3. Entwicklung spezifischer Marker für $Pl_1$**

Um die neu identifizierten AFLP-Marker im Rahmen einer markergestützten Selektion effektiv einsetzen zu können, ist die Umwandlung von AFLP1 und AFLP2 in SCAR-Marker angestrebt worden. SCAR-Marker sind im Vergleich zu den ursprünglichen AFLP-Markern einfacher handhabbar und preiswerter (SHAN et al., 1999).

Die Konvertierung von AFLP-Markern in SCAR-Marker wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben (z. B. MEKSEM et al., 1995; BRADEEN und SIMON, 1998; SHAN et al., 1999; NEGI et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte einer der beiden am engsten gekoppelten AFLP-Marker, AFLP1, sowohl in einen CAPS- als auch in einen SCAR-Marker umgewandelt werden.

Als Ergebnis der Sequenzierung der ausgeschnittenen und klonierten AFLP-Banden wurden für beide AFLP-Marker Klone mit unterschiedlicher Basensequenz aus dem-

selben Transformationsvorgang identifiziert. Das Insert, welches in der Mehrzahl der Klone eines Transformationsvorgangs sequenziert worden war, stellte sich in beiden Fällen später auch als dasjenige heraus, welches das ursprüngliche AFLP-Markerfragment enthielt. Dieses Phänomen war bereits in den Arbeiten von SHAN et al. (1999) aufgetreten und deutet darauf hin, dass außer dem Markerfragment weitere im Hintergrund vorhandene 'Schattenbanden' der gleichen Fragmentgröße vom AFLP-Gel mit ausgeschnitten und kloniert wurden.

Das Hauptproblem bei der Erstellung von SCAR-Markern auf der Basis von AFLP-Fragmenten scheint darin zu liegen, den AFLP-Polymorphismus auf die SCAR-Marker zu übertragen. In den meisten Fällen wird zwar ein Fragment amplifiziert, dieses ist aber häufig nicht polymorph (MEKSEM et al., 1995; SHAN et al., 1999; NEGI et al., 2000). MEKSEM et al. (1995) führen dies auf die eventuell zu geringe Fragmentgröße des SCAR-Amplifikats von nur 80-120 bp zurück. SHAN et al. (1999) gehen davon aus, dass das Problem in der Natur der AFLP-Marker begründet liegt: Die SCAR-Primer-Sequenzen liegen zumeist im mittleren Bereich des AFLP-Fragments, während der Polymorphismus des AFLP-Markers AFLP-Primer-spezifisch sein kann. Er wäre in diesem Fall mit den SCAR-Primern nicht reproduzierbar. NEGI et al. (2000) betonen, dass es wichtig ist, die flankierenden Regionen des AFLP-Fragments bei der SCAR-Marker Entwicklung mit zu berücksichtigen um so mögliche Unterschiede in den Enzymschnittstellen zu identifizieren und gleichzeitig die Fragmentlänge des SCAR-Amplifikats zu vergrößern.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnten mit den auf der Basis der Sequenz des AFLP-Markerfragments erstellten SCAR-Primern auf Agarose-Gelen kein Unterschied zwischen anfälligen und resistenten Genotypen erkennbar gemacht werden. Erst mit Hilfe der hochauflösender SSCP-Gele war dieses möglich. Die Hybridisierung der AFLP-Fragmente mit Sonden aus SCAR-Amplifikationen von anfälligen und resistenten Genotypen ergab unabhängig von der Sonde grundsätzlich nur dann ein Signal, wenn der zur AFLP-Reaktion eingesetzte Genotyp resistent war. Die Unterschiede zwischen SCAR-Fragmenten von anfälligen und von resistenten Genotypen müssen demnach äußerst gering sein, was durch die getrennte Sequenzierung dieser Fragmente bestätigt werden konnte. Abweichend von den Arbeiten von SHAN et al. (1999) und NEGI et al. (2000) lagen die Basenunterschiede jedoch im mittleren Bereich des AFLP-Fragments. Durch Berücksichtigung der identifizierten SNP's (Single

Nucleotide Polymorphism) bei der Primer-Erstellung war es möglich, für AFLP1 den polymorphen SCAR-Primer AU1b-SCAR zu entwickeln.

Als Alternative zum SCAR-Marker ist es durch Identifikation einer Restriktionsschnittstelle des Enzyms *Dde* I im Bereich der SNP's gelungen, den auf Agarosegelen nicht polymorphen SCAR-Marker AU1a-SCAR in einen polymorphen codominanten CAPS-Marker umzuwandeln. Versuche, den CAPS-Marker in einer markergestützten Selektion von spaltenden Nachkommenschaften mit anderem genetischen Hintergrund einzusetzen, zeigten, dass der Marker unabhängig vom genetischen Hintergrund spaltet (C. JAMES, pers. Mitteilung). Der größere finanzielle Aufwand für AU1a-CAPS durch den Einsatz eines Restriktionsenzym ist im Hinblick auf einen Einsatz in einer markergestützten Selektion großer Nachkommenschaften jedoch negativ zu bewerten.

Im Bezug auf AFLP2 war auch das Amplifikationsprodukt des SCAR-Markers, der unter Berücksichtigung der identifizierten Sequenzunterschiede erstellt worden war, nicht polymorph. Ein Grund dafür könnte eine noch nicht optimale Primersequenz sein. Schon die Auftrennung auf einem SSCP-Gel ergab für AU2a-SCAR ein viel komplexeres Bandenmuster im Bereich der Markerbande als dies bei AU1a der Fall war. Entsprechend schwieriger ist es wahrscheinlich auch, den Sequenzunterschied zu finden, der den Unterschied zwischen resistenten und anfälligen Genotypen in der AFLP-Marker-Analyse bedingt. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass im Fall von AFLP2, ähnlich wie bei NEGI et al. (2000) beschrieben, zusätzlich Unterschiede im Bereich der Enzymschnittstellen für den Polymorphismus auf AFLP-Ebene verantwortlich sind.

#### **4.4. Charakterisierung von *Podosphaera leucotricha***

Die Charakterisierung von physiologischen Rassen von *Podosphaera leucotricha* ist eine wichtige Voraussetzung für die Züchtung dauerhaft resistenter Apfelsorten. Mit Hilfe der Bestimmung von Virulenzunterschieden des Pathogens kann dessen Entwicklung klarer eingeschätzt werden, was eine deutlich verbesserte Beurteilung von Resistenz innerhalb des Zuchtmaterials bedeuten würde.

Die Existenz physiologischer Rassen von *Podosphaera leucotricha* ist zwar schon von vielen Autoren vermutet worden (SCHANDER, 1958; BLUMER, 1967; MIHATSCH und MILDENBERGER, 1967; ALSTON, 1969 und 1983; COYIER, 1974; KORBAN und DAY-

TON, 1983; GOONEWARDENE et al., 1986, SCHEEWE, 1990), jedoch war KRIEGHOFF (1995) der erste, der durch gezielte Erstellung und Untersuchung von Einsporisolen des Erregers einen begründeten Hinweis zur Existenz von Pathotypen lieferte.

Die Natur des Erregers als obligat biotropher Parasit, der mit dem Wind verbreitet wird, macht die Kultur von *Podosphaera leucotricha* isoliert von der Außenwelt auf ganzjährig belaubtem Pflanzenmaterial der Gattung *Malus* notwendig. Deshalb wurde eine Kultur des Erregers unter *in vitro*-Bedingungen gewählt. Die Sorte 'Gibb's Golden Gage' hatte sich in den Arbeiten von KRIEGHOFF (1995) als besonders anfällig für Echten Mehltau herausgestellt und konnte auch in der vorliegenden Arbeit erfolgreich als Wirt für Einsporisolate eingesetzt werden. Zur Charakterisierung von Einsporisolaten ist zunächst die Inokulation von *in vitro*-Material verschiedener *Malus*-Genotypen, wie auch bei SCHEEWE (1990) und KRIEGHOFF (1995) beschrieben, durchgeführt worden. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass alle *in vitro* getesteten *Malus*-Genotypen von sämtlichen im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Einsporisolaten des Erregers infiziert werden konnten. Selbst an Sprossen der Wildart *Malus hupehensis*, welche bei SCHEEWE (1990) und KRIEGHOFF (1995) befallsfrei geblieben waren, konnte sporulierender Befall beobachtet werden. SCHEEWE (1990) konnten unter *in vitro*-Bedingungen sowohl an Genotypen mit PI<sub>1</sub>-Resistenz als auch an Genotypen mit PI<sub>2</sub>-Resistenz nach Inokulation mit einem lokalen Mischinokulum Befall induzieren. Die Anfälligkeit resistenter Genotypen *in vitro* ist entgegen der Ansicht von KRIEGHOFF (1995) wahrscheinlich auf Veränderungen in der Blattmorphologie zurückzuführen, die in Zusammenhang mit der *in vitro*-Kultur stehen.

KRIEGHOFF (1995) stellte einen engen Zusammenhang zwischen *in vitro*-Ergebnissen und Freilandbonituren fest. Wenn jedoch Genotypen, die langjährig an verschiedenen Standorten als resistent beurteilt worden waren, *in vitro* infiziert werden, kann dies nicht zutreffen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist deshalb davon Abstand genommen worden, Infektionsversuche an *in vitro*-Material durchzuführen.

Da keine geeignete Methode zur Unterscheidung der etablierten Einsporisolate auf phytopathologischer Basis zur Verfügung stand, wurden die Isolate zunächst auf molekularer Ebene miteinander verglichen. Ziel der molekularen Untersuchungen war es, die genetische Variabilität der Einsporisolate festzustellen und die Anzahl der Iso-

late für die anschließende phytopathologische Charakterisierung auf unterscheidbare einzuschränken. Die Wahrscheinlichkeit einer Erfassung physiologischer Rassen des Erregers unter den Einsporisolaten setzt voraus, dass die in den Inokulationsversuchen eingesetzten Isolate genetisch divers sind.

Der Vergleich der genetischen Variabilität zwischen Isolaten von unterschiedlichen Standorten gibt Aufschluss über die Mutationsrate des Erregers und ermöglicht dadurch eine Einschätzung der zu erwartenden Virulenzentwicklung. Dieses ist eine Grundvoraussetzung für die Züchtung dauerhaft resistenter Apfelsorten (SIEROTZKI und GESSLER, 1998). Molekulare Untersuchungen beim Erreger des Apfelschorfs, *Venturia inaequalis*, haben gezeigt, dass vor allem die geringe genetische Variabilität im aktuellen Sortenspektrum, verbunden mit einem monokultur-ähnlichen Anbausystem von Sorten mit gleichen Resistenzgenen, den Selektionsdruck zur Überwindung von Schorfresistenz stark vergrößert (SIEROTZKI et al., 1994; TENZER und GESSLER, 1994; TENZER et al., 1999). Ein solcher Selektionsdruck wird unter vergleichbaren Anbaubedingungen höchstwahrscheinlich auch im Bezug auf den Echten Mehltau am Apfel wirken.

Die molekulare Charakterisierung von *Podosphaera leucotricha* zeigte, dass die genetische Variabilität des Erregers sehr gering ist. Aus diesem Grund konnte mit einer DNA-Isolierung nach dem PEX-Protokoll in Verbindung mit einer Analyse auf RAPD-Marker-Basis kein auswertbares Ergebnis erzielt werden. Erst nach Anwendung der AFLP-Technik standen genügend polymorphe Marker für die Erstellung eines Dendrogramms zur Verfügung. Die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der identifizierten Marker war dafür eine wichtige Voraussetzung, denn obwohl die AFLP-Technik sehr verlässliche Ergebnisse liefert, sind nicht alle Banden eines AFLP-Gels grundsätzlich reproduzierbar (VAN TREUREN, 2001).

McDERMOTT et al. (1994) konnten beim Gerstenmehltau (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*), einem Erreger, der sich sehr stark auch über die sexuelle Phase verbreitet, mit Hilfe von RAPD-Markern einen Polymorphiegrad von 47 % feststellen.

DELEYE et al. (1995, 1997) zeigten beim Rebenmehltau (*Uncinula necator*), dass Isolate aus Primärbefall mit Hilfe von RAPD-Markern eindeutig von Isolaten aus Sekundärbefall unterscheidbar sind. Sie vermuten, dass es sich hier um zwei unterschiedliche Formen des Erregers handelt. Dass Ascosporen entgegen bisheriger Vermutun-

gen auch im Rebenmehltau eine wichtige Quelle von Inokulum darstellen, wurde von CORTESI et al. (1997) gezeigt. DELEYE et al. (1997) konnten außerdem auf molekularer Ebene nachweisen, dass nicht der Wind sondern vielmehr der Transport von Pflanzenteilen durch den Menschen das wichtigste Medium für die Verbreitung von Genotypen des Erregers darstellt. Rund 50% der getesteten RAPD-Primer ergaben beim Rebenmehltau polymorphe Marker (DELEYE et al., 1995).

Bei Ascomyceten wird die sexuelle Entwicklung von einem einzelnen Genlocus ("mating type locus") kontrolliert (TURGEON, 1998). Die beiden Allele, die den "mating type" bedingen, sind genetisch voneinander völlig verschieden, jedoch an der gleichen Position im Genom lokalisiert. Der "mating type" ist deshalb mit molekularen Methoden einfach zu identifizieren. Die beiden "mating types" von *Phytophthora infestans* konnten in dem von PURVIS et al. (2001) mit Hilfe der AFLP-Technik erstellten Dendrogramm zwei unterschiedlichen Clustern zugeordnet werden, was darauf hindeutet, dass zwischen den beiden "mating types" des Erregers der Genfluß sehr beschränkt ist.

Der Polymorphiegrad auf AFLP-Ebene lag bei *Phytophthora infestans* bei rund 20%. Bei AFLP-Analysen des bodenbürtigen Erregers der "braunen Stengelfäule" an Sojabohnen, *Phialophora gregata*, waren 36% der Banden polymorph (MENG und CHEN, 2001). Der in der vorliegenden Arbeit für *Podosphaera leucotricha*-Isolate detektierte Polymorphiegrad von weniger als 1% deutet darauf hin, dass die sexuelle Phase des Erregers für die Verbreitung des Pathogens nicht von Bedeutung ist. Dies wurde von vielen Autoren bisher auch postuliert (KOTTE, 1958; SCHANDER, 1958; ALEXOPOULOS, 1966; BÖMEKE, 1978; ZELLER, 1989; HOFFMANN et al., 1994; FRIEDRICH und RODE, 1996).

Das auf 31 Einsporisolaten von *Podosphaera leucotricha* basierende Dendrogramm ist in zwei Hauptcluster unterteilt, die generell eine Unterscheidung von Isolaten aus Primär- und Sekundärbefall darstellt, wie sie auch beim Rebenmehltau (DELEYE et al., 1995, 1997) beobachtet worden war. Jedoch spricht die Positionierung von wenigen Isolaten aus Sekundärbefall (Ahr-G1, Ahr-G2, Ahr-G4, Ahr-A und Ahr-D) im "Primärbefalls-Cluster" gegen diese Hypothese. Auch die Annahme, dass die beiden Cluster den Unterschied zwischen Isolaten von Standorten innerhalb und außerhalb Deutschlands widerspiegeln, wird durch die Lokalisierung der oben genannten Isolate im Cluster der "nicht-deutschen" Isolate widerlegt.

Es besteht die Möglichkeit, dass die Auftrennung der Isolate in zwei Cluster auf eine genetische Distanz der beiden Paarungstypen des Erregers zurückzuführen ist, wie es auch PURVIS et al. (2001) für *Phytophthora infestans* beschrieben haben. COYIER (1974) konnte zeigen, dass auch *Podosphaera leucotricha* heterothallisch ist.

Durch Paarungsversuche mit den Isolaten des Dendrogramms, wie sie von COYIER (1974) durchgeführt worden sind, könnte diese Hypothese überprüft werden. Aus Zeitgründen konnte dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit aber nicht geschehen.

Die Verteilung innerhalb des Clusters, in dem alle "nicht-deutschen" Isolate enthalten sind, zeigt, dass die genetische Distanz der "nicht-deutschen" Isolate zu jenen aus Ahrensburg zunimmt, je weiter der Herkunftsort von Ahrensburg entfernt ist. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass, wie bereits bei DELEYE et al (1997) für Rebenmehltau beschrieben, dem Wind als Medium zur Verbreitung von *Podosphaera leucotricha* über größere Entfernungen eine geringere Bedeutung zukommt, als dies beispielsweise beim Getreidemehltau (McDERMOTT et al., 1994) der Fall ist.

SIEROTZKI et al. (1994) konnten nachweisen, dass Isolate des Erregers des Apfelschorfs, *Venturia inaequalis*, eine hohe Wirtsspezialisierung besitzen. So war es zwar möglich, Isolate von verschiedenen Wirtspflanzen mit Hilfe molekularer Marker voneinander zu unterscheiden, an Isolaten des gleichen Wirts jedoch war dies oft nicht möglich. Bei Inokulationsversuchen zeigte ein Isolat die größte Virulenz immer auf dem *Malus*-Genotyp, von dem es isoliert worden war.

Eine ähnliche Wirtsspezialisierung des Pathogens könnte auch im Fall von *Podosphaera leucotricha* vorliegen. Dies würde erklären, warum die Isolate von 'Bittenfelder Sämling' und auch die Isolate aus East Malling eine äußerst geringe genetische Variabilität zeigen. Es würde auch erklären, warum die Isolate Ahr-G1, Ahr-G2 und Ahr-G4, welche von dem unmittelbar neben 'Bittenfelder Sämling' wachsenden *Malus* 'Gibb's Golden Gage' isoliert worden waren, genetisch sehr verschieden von den Isolaten von 'Bittenfelder Sämling' sind. In Angers hingegen, wo nach LESPINASSE et al. (1976) äußerst günstige Bedingungen für die Entwicklung von *Podosphaera leucotricha* herrschen, könnte wegen einer entsprechend häufiger stattfindenden sexuellen Reproduktion die genetische Variabilität des Erregers deutlich größer als in Ahrensburg oder East Malling sein. Dies könnte der Grund dafür sein, dass die vier französischen Isolate, welche von einer einzigen Apfelsorte ('Golden Delicious') des Standorts Angers erstellt worden waren, genetisch sehr verschieden sind.

Auf der Basis ihrer im Dendrogramm visualisierten genetischen Distanz wurden sechs Isolate, die fünf verschiedene Herkunftsländer repräsentieren, für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Nach der Gen-für-Gen-Hypothese von FLOHR (1971) wird bei ADAM und SOMERVILLE (1996) eine physiologische Rasse definiert als ein virulentes Pathogen, welches in der Lage ist, den Resistenzmechanismus einer Wirtspflanze zu überwinden. Entweder, indem es vom Resistenzmechanismus der Pflanze nicht erkannt wird, oder aber, indem es den Resistenzmechanismus außer Kraft setzt. HOFFMANN et al. (1994) bezeichnen eine physiologische Rasse als eine durch unterschiedliches Infektionsvermögen gekennzeichnete Untereinheit eines Erregers. Dies bedeutet für die vorliegende Arbeit, dass über isolatabhängige Resistenzunterschiede zwischen *Malus*-Genotypen physiologische Rassen des Erregers identifiziert werden können. Dabei kann auch ein unter Freilandbedingungen anfälliger *Malus*-Genotyp Träger eines Resistenzgens sein. Ein Beispiel hierfür ist die Apfelsorte 'Golden Delicious', welche die  $V_9$ -Resistenz gegen die Schorfrasse 7 besitzt, für alle anderen Schorfrassen jedoch hochanfällig ist (MACHARDY et al., 2001).

Es ist in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen worden, dass physiologische Rassen, sofern sie innerhalb der 31 etablierten Isolaten vorkommen sollten, durch Pathogenitätsunterschiede der sechs ausgewählten Einsporisolate identifiziert werden könnten. Als Pflanzenmaterial für die Inokulationsversuche ist auf das zur Selektion neuer Resistenzquellen verwendete *Malus*-Testsortiment (Kapitel 7.1.1.) zurückgegriffen worden, welches neben den bei KRIEGHOFF (1995) verwendeten Wildarten oder Wildartderivaten mit zumeist monogen bedingter Resistenz auch Kultursorten mit verschieden stark ausgeprägter polygen bedingter Resistenz beinhaltet. Im Bereich der alten Kultursorten werden Genotypen erwartet, bei denen sich durch langjährige Koevolution mit dem Erreger rassenspezifische Resistenzen entwickelt haben können. Als ein zusätzlich positiver Nebeneffekt der Inokulationsversuche wird die Resistenz der *Malus*-Genotypen des Testsortiments auf diese Weise genauer charakterisiert.

Für die Durchführung von Inokulationsversuchen hat sich die Inokulation von abgetrennten Einzelblättern von Gewächshauspflanzen mit Hilfe eines Inokulationsturms als effektivste Methode erwiesen. Diese Inokulationsweise ist bereits bei Gerstenmehltau (McDERMOTT et al., 1994), Weizenmehltau (HSAM et al., 1998), Echtem Mehltau an Melone (HOSOYA et al., 1999), Süßkirsche (OLMSTEAD et al., 2001a, 2001b) oder Rose (LINDE und DEBENER, 2002) mit Erfolg durchgeführt worden. Eine Inokulation durch Überstreichen von infizierten Blättern, wie bei KRIEGHOFF (1995) für Apfelmehltau sowie DOSTER und SCHNATHORST (1985) oder DELEYE et al. (1997) für Rebenmehltau beschrieben wurde, ist bei den ersten Sprossinokulationsversuchen zunächst verwendet worden, wurde dann jedoch wegen der mangelnden Standardisierbarkeit und Schwierigkeiten in der Auswertung verworfen. Eine Inokulation mit Hilfe einer Konidien suspension (SCHEEWE, 1990) wird von vielen Autoren abgelehnt, weil die hydrophoben Konidien in Wasser leicht verklumpen und die Keimfähigkeit sehr schnell nachlässt (SCHANDER, 1958; BLUMER, 1967; KASPERS, 1967; GOSZYNSKI und CIMANOWSKI, 1985; KRIEGHOFF, 1995). XU und BUTT (1998) haben bei Inokulationsversuchen mit *Podosphaera leucotricha* Konidien mit einem Pinsel übertragen und eine sehr große Variation von 10-45 % Inokulationserfolg beobachtet. In der vorliegenden Arbeit sollten durch die Verwendung des Inokulationsturms gleichmäßige Konidiendichten auf die Blätter aufgebracht werden, um so eine mögliche Variation im Infektionsergebnis zu minimieren.

Zur Vermeidung einer Kontamination mit Mikroorganismen wurde bei Mehltau-Inokulationsversuchen an Weinrebe (DELEYE et al., 1995; PAUQUET et al., 2001), Poinsettia (CELIO und HAUSBECK, 1998), Melone (HOSOYA et al., 1999) oder Süßkirsche (GROVE und BOAL, 1991; OLMSTEAD et al., 2001a, 2001b) eine Oberflächensterilisation durchgeführt. Im Bezug auf den Apfel hat sich diese Methode jedoch als nicht sinnvoll erwiesen. Vermutlich wegen einer starken Absonderung von phenolischen Substanzen als Folge kleinster Verletzungen der Blattoberfläche während der Oberflächensterilisation haben nur wenige Blätter bis zum Zeitpunkt der Auswertung überlebt. Ähnliche Effekte wurden auch bei der Inkulturnahme von *Malus*-Sprossspitzen *in vitro* festgestellt (SCHEEWE et al., 1990; KRIEGHOFF, 1995). Bei Versuchen zur Oberflächensterilisation wurde zudem festgestellt, dass auf Blättern resistenter Genotypen Mehltaukolonien auftraten, ohne dass diese zuvor mit dem Erreger inokuliert worden waren. Daraus kann man schließen, dass auf dem Blatt

bereits vorhandene Sporen von *Podosphaera leucotricha* den Sterilisationsprozess überlebt haben und sich die Blattoberfläche durch die Oberflächenbehandlung derart verändert haben muss, dass eine Infektion stattfinden konnte.

Da eine Kontamination mit anderen Mikroorganismen durch die Verwendung von Benzimidazol-Agar als Kulturmedium (HSAM et al., 1998) ausreichend unterdrückt werden konnte, ist in der vorliegenden Arbeit auf die Oberflächensterilisation verzichtet worden.

Als ausschlaggebend für das spätere Inokulationsergebnis hat sich das Alter des eingesetzten Blattmaterial herausgestellt. Es war selbst bei sehr anfälligen Genotypen wie 'Gibb's Golden Gage' nicht möglich, einen Befall auf ausgewachsenen Blättern zu induzieren. Diese auch als ontogene Resistenz bezeichnete "Altersresistenz" von Blättern wurde bereits von vielen Autoren im Bezug auf Apfelmehltau beschrieben (KOTTE, 1958; SCHANDER, 1958; SEEM und GILPATRICK, 1980; ELLIS et al., 1981; GOSZCZYNSKI und CIMANOWSKI, 1985; LALANCETTE und HICKEY, 1985) und konnte auch an *in vitro*-Sprossen beobachtet werden (SCHEEWE, 1990; KRIEGHOFF, 1995). Ontogene Resistenz ist eine Hauptursache für Unregelmäßigkeiten im Inokulationsergebnis. Da nicht immer alle *Malus*-Genotypen zum Zeitpunkt der Inokulation Blätter im 'richtigen' Altersstadium hatten, wurden zum Teil auch suboptimale Blattstadien in den Inokulationsversuchen eingesetzt. Deshalb wurde ein *Malus*-Genotyp selbst dann für anfällig für ein Einsporisolat erklärt, wenn er in nur einer Wiederholung infiziert war.

Das als Ergebnis der Inokulationsversuche erstellte *Malus*-Differentialsortiment ermöglicht eine Unterscheidung von fünf Einsporisolaten, die fünf unterschiedliche Herkunftsländer repräsentieren. Damit kann eine Existenz von physiologischen Rassen des Erregers als gegeben betrachtet werden. Gleichzeitig wird durch das Differentialsortiment gezeigt, dass Resistenzen von *Malus*-Genotypen rassenspezifisch sein können. Im Hinblick auf eine Züchtung dauerhaft mehlttauresistenter Apfelsorten muss somit der Rassenspezifität von Mehlttauresistenz bei einer "Pyramidisierung" verschiedener Resistenzgene besondere Beachtung zukommen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommene Charakterisierung des *Malus*-Testsortiments mit sechs ausgewählten Einsporisolaten gibt einen ersten Hinweis auf

eine rassenabhängige Resistenz von Genotypen des Sortiments und trägt somit zur Charakterisierung potentieller neuer Resistenzquellen bei.

## 6. Literaturverzeichnis

- ADAM, L. und SOMERVILLE, S. C. (1996): Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 9, 341-356
- ALEXOPULOS, C. J. (1966): Einführung in die Mykologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Seite 236-241
- ALSTON, F. H. (1969): Response of apple cultivars to mildew, *Podosphaera leucotricha*. Rep. E. Malling Res. Stn. for 1968, 133-135
- ALSTON, F. H. (1976): Practical aspects of breeding for mildew (*Podosphaera leucotricha*) resistance in apple. Proceedings of the Eucarpia meeting of tree fruit breeding, Wageningen, 7. – 10. 9. 1976
- ALSTON, F. H. (1983): Progress in transferring mildew (*Podosphaera leucotricha*) resistance from *Malus* species to cultivated apple. WPRS Bulletin 'Disease resistance as component of integrated control in orchards', Angers, 8. - 9. 3. 1983
- BATLLE, I. Und ALSTON, F. H. (1996): Genes determining leucine aminopeptidase and mildew resistance from the ornamental apple 'White Angel'. *Theor. Appl. Genetics* 93: 179-182
- BLUMER, S. (1967): Echte Mehltaupilze (*Erysiphaceae*). VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- BÖMEKE, H. (1978): Der Apfelmehltau: Der Pilz und seine Bekämpfungszeit. *Mitteilungen des OVR* 33, 190-198
- BRADEEN, J. M. und SIMON, P. W. (1998): Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y<sub>2</sub> locus to a simple, codominant PCR-based marker form. *Theor. Appl. Genetics* 97, 960-967
- BRAUN, U. (1995): The powdery mildews of Europe. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, New York, Seite 93-94
- BUS, V., RANATUNGA, C., GARDINER, S., BASSET, H. und RIKKERINK, E. (2000): Marker assisted selection for pest and disease resistance in the New Zealand apple breeding programme. *Acta Hort* 538, 541-547
- CELIO, G. J. und HAUSBECK, M. K. (1998): Conidial germination, infection structure formation and early colony development of powdery mildew on poinsettia. *Phytopathology* 88, 105-113
- CHENG, S., WEEDEN, N. F., BROWN, S. K., ALDWINCKLE, H. S., GARDINER, S. E. und BUS, V. (1998): Development of a DNA-marker for V<sub>m</sub>, a gene conferring resistance to apple scab. *Genome* 41, 208-214
- CORTESI, P., BISACH, M., RICCOLINI, M. und GADOURI, D. M. (1997): Cleistothetia of *Uncinula necator* – An additional source of inoculum in Italian vineyards. *Plant Disease* 81, 922-926
- COYIER, D. L. (1974): Heterothallism in the apple powdery mildew fungus, *Podosphaera leucotricha*. *Phytopathology* 64, 246-248

- DAYTON, D. F. (1977): Genetic immunity to apple mildew incited by *Podosphaera leucotricha*. HortScience 12, 225-226
- DÉLEYE, C., CORIO-COSTET, M.-F. und LAIGRET, F. (1995): A RAPD assay for strain typing of the biotrophic grape powdery mildew fungus *Uncinula necator* using DNA extracted from the mycelium. Experimental Mycology 19, 234-237
- DÉLEYE, C., LAIGRET, F. und CORIO-COSTET, M.-F. (1997a): RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. Phytopathology 87, 670-677
- DOSTER, M. A. und SCHNATHORST, W. C. (1985): Effects of leaf maturity and cultivar resistance on development of the powdery mildew fungus on grapevines. Phytopathology 75, 318-321
- DOYLE, J. J. und DOYLE J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer. 19, 11-15
- DUREL, C. E., PARISI, L., Laurens, F., VAN De WEG, E., LIEBHARD, R., KOLLER, B. und JOURJON, M. F. (2002): Genetic dissection of partial resistance against two monoconidial strains of the new race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. Zur Veröffentlichung eingereicht.
- DURHAM, R. E. und KORBAN, S. S. (1994): Evidence of gene introgression in apple using RAPD markers. Euphytica 79, 109-114
- ELLIS, M. A., FERREE, D. C. und SPRING, D. E. (1981): Photosynthesis, transpiration and carbohydrate content of apple leaves infected by *Podosphaera leucotricha*. Phytopathology 71, 392-395
- FISCHER, C. (1994a): Nutzung von *Malus*-Wildarten und Kultursorten in der Resistenzzüchtung beim Apfel. Vorträge für Pflanzenzüchtung 27, 38-50
- FISCHER, C. (1994b): *Malus*-Wildarten als Resistenzquelle gegen Mehltau in der Apfelzüchtung. Vorträge für Pflanzenzüchtung 27, 75-79
- FISCHER, C. (1994c): Breeding apple cultivars with multiple resistance. H. Schmidt and M. Kellerhals (Eds.): Progress in temperate fruit breeding, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- FISCHER, C., BONDARENKO, A. und ARTAMONOVA, E. (1994): Results on the stability of scab resistance in apple breeding. H. Schmidt and M. Kellerhals (Eds.): Progress in temperate fruit breeding, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- FISCHER, M., MILDENBERGER, G., BÜTTNER, R., HAMMER, K. und SCHMIDT, J. (1984): Der Genfonds an *Malus*-arten in der DDR und seine Nutzung. Kulturpflanze 32, 123-142
- FRIEDRICH, G. und RODE, H. (1996): Pflanzenschutz im integrierten Obstbau. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- GALLOT, J. C., LAMB, R. C. und ALDWINCKLE, H. S. (1985): Resistance to powdery mildew from some small-fruited *Malus* cultivars. HortScience 20, 1085-1087
- GESSLER, C. und BLAISE, P. (1994): Differential resistance in apple against scab and its use in breeding and in orchard planting strategies to control the disease. H. Schmidt and M. Kellerhals (Eds.): Progress in temperate fruit breeding, Kluwer Academic Publishers, Netherlands

- GIEFFERS, W. (1999): Methodik der quantitativen Resistenzprüfung. Labor-Arbeitspapier, Dr Werner Gieffers, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln
- GOONEWARDENE, H. F., KWOLEK, W. F. und WILLIAMS, E. B. (1986): Survival of European red mite on apples with different levels of susceptibility to powdery mildew. *HortScience* 21, 1222-1224
- GOSZCZYNSKI, W. und CIMANOWSKI, J. (1985): Evaluation of inoculation techniques of apple leaves with conidia of the fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm. under laboratory conditions. *Fruit Science Reports* 12, 103-107
- GROVE G. G. und BOAL, R. J. (1991): Factors affecting germination of *Podosphaera clandestina* on leaves and fruit of sweet cherry. *Phytopathology* 81, 1513-1518
- HEMMAT, M., WEEDEN, N. F., MANGANARIS, A. G. und LAWSON, D. M. (1994): Molecular marker linkage map for apple. *Journal of Heredity* 85, 4-11
- HEMMAT, M., WEEDEN, N. F., ALDWINCKLE H. S. und BROWN, S. K. (1998): Molecular markers for the scab resistance ( $V_f$ ) region in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Science* 123, 992-996
- HOFFMANN, G. M., NIENHAUS, F., POEHLING, H.-M., SCHÖNBECK, F., WELZIEN, H. C. und WILBERT, H. (1994): Lehrbuch der Phytomedizin, 3. Auflage. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
- HOSOYA, K., NARISAWA, K., PITRAT, M. und EZURA, H. (1999): Race identification in powdery mildew (*Spaerotheca fuliginea*) on melon (*Cucumis melo*) in Japan. *Plant Breeding* 118, 259-262
- HSAM, S. L. K., HUANG, X. Q., ERNST, F., HARTL, L. und Zeller, F. J. (1998): Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). 5.) Alleles at the Pm1 locus. *Theor. Appl. Genetics* 96: 1129-1134
- JANSE, J., VERHAEGH, J. J. und DEN NIJS, A. P. M. (1994): Early selection for partial resistance to powdery mildew, *Podosphaera leucotricha* (ell. Et Ev.) Salm. in apple progenies. H. Schmidt and M. Kellerhals (Eds.): Progress in temperate fruit breeding, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- JHINGAN, A. K. (1992): A novel technology for DNA isolation. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 3, 15-22
- KASPERS, H. (1967): Ein Beitrag zur Biologie und Bekämpfung des Apfelmehltaus (*Podosphaera leucotricha* [Ell. & Ev.] Salm.). *Pflanzenschutz-Nachrichten "Bayer"* 4, 689-703
- KELLERHALS, M. und FURRER, B. (1994): Approaches for breeding apples with durable disease resistance. H. Schmidt and M. Kellerhals (Eds.): Progress in temperate fruit breeding, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- KELLERHALS, M., DOLEGA, E., DILWORTH, E., KOLLER, B. und GESSLER, C. (2000): Advances in marker-assisted apple breeding. *Acta Hort.* 538, 535-540
- KELLY, J. D. (1995): Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. *HortScience* 30, 461-465

- KING, G. J. (1991): The European Apple Genome Mapping Project: Developing a strategy for mapping genes coding for agronomic characters in tree species. *Euphytica* 56, 89-94
- KING, G. J., TARTARINI, S., BROWN, L., GENNARI, F. und SANSAVINI, S. (1999): Introgression of the  $V_f$ -source of scab resistance and distribution of linked marker alleles within the *Malus* gene pool. *Theor. Appl. Genetics* 99, 1039-1046
- KNAPP, S. J. (1998): Marker-assisted selection as a strategy for increasing the probability of selecting superior genotypes. *Crop Science* 38, 1164-1174
- KNIGHT, R. L. und ALSTON, F. H. (1968): Sources of field immunity to mildew (*Podosphaera leucotricha*) in Apple. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 10, 294-298
- KONIECZYN, A. und AUSUBEL, F. M. (1993): A procedure for mapping *Arabidopsis* mutants using codominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant Journal* 4, 403-410
- KORBAN, S. S. und DAYTON, D. F. (1983): Evaluation of *Malus* germplasm for resistance to powdery mildew. *HortScience* 18, 219-220
- KORBAN, S. S. und RIEMER, S. E. (1990): Genetics and histology of powdery mildew resistance in apple. *Euphytica* 48, 261-267
- KOTTE W. (1958): Krankheiten und Schädlinge im Obstbau III: Krankheiten und Schädlinge am Apfel. 3. Auflage. Verlag Paul Parey, Hamburg Seite 184-191.
- KRIEGHOFF, O. (1995): Entwicklung einer In-vitro-Selektionsmethode auf Resistenz von *Malus*-Genotypen gegenüber *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm. und *in vitro*-Differenzierung von Virulenzunterschieden des Erregers. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin
- KRÜGER, J. (1991): Schorfbefall von Nachkommen aus Kreuzungen mit der schorffresistenten Apfelsorte 'Prima'. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 98, 73-76
- KRÜGER, J. (1994): Observations on different mildew sources used in apple breeding at Ahrenburg, H. Schmidt and M. Kellerhals (Eds.): Progress in temperate fruit breeding, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- KRÜGER, J. (1995): Mehltaresistenzzüchtung beim Apfel in Ahrensburg: Quellen und deren Beständigkeit. *Gartenbauwissenschaft* 60, 269-275
- LALANCETTE jr., N. und HICKEY, K. D. (1985): Apple powdery mildew disease progress on sections of shoot growth: An analysis of leaf maturation and fungicide effects. *Phytopathology* 75, 130-134
- LESPINASSE, Y., DECOURTYE, L. und RENOUX, A. (1976): Selecting minor genes in apple progenies for resistance to mildew (*Podosphaera leucotricha*). Proceedings of the Eucarpia meeting of tree fruit breeding, Wageningen, 7.-10- 9. 1979
- LINDE M. und DEBENER, T. (2002): Markergestützte Kartierung eines Resistenzgens gegen den echten Mehltau an Rosen (*Podosphaera pannosa*). *Vorträge für Pflanzenzüchtung* 54, 287-290
- LUBY, J. J. und SHAW, D. V. (2001): Does marker-assisted selection make dollars and sense in a fruit breeding program? *HortScience* 36, 872-879

- MACHARDY, W. E., GADOURY, D. M. und GESSLER, C. (2001): Parasitic and biological fitness of *Venturia inaequalis*: relationship to disease management strategies. *Plant Disease* 85, 1036-1051
- MARKUSSEN, T., KRÜGER, J., SCHMIDT, H. und DUNEMANN, F. (1995): Identification of PCR-based markers linked to the powdery-mildew-resistance gene  $PI_1$  from *Malus robusta* in cultivated apple. *Plant Breeding* 114, 530-534
- MARKUSSEN T. (1996): Identifizierung molekularer Marker für die Mehltaresistenzgene  $PI_1$  und  $PI_2$  des Apfels. Dissertation, Universität Hamburg
- McDERMOTT, J. M., BRÄNDLE, U., DUTLY, F., HAEMMERLI, U. A., KELLER, S., MÜLLER, K. E. und WOLFE, M. S. (1994): Genetic variation in powdery mildew of barley: Development of RAPD, SCAR and VTN markers. *Phytopathology* 84, 1316-1321
- MEHLENBACHER, S. A. (1995): Classical and molecular approaches for breeding fruit and nut crops for disease resistance. *HortScience* 30, 466-477
- MEKSEM, K., LEISTER, D., PELEMANN, J., ZABEAU, M., SALAMINI, F. und GEBHARDT, C. (1995): A high-resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP-Markers. *Mol. Gen. Genet.* 249, 74-81
- MENG, X. und CHEN, W. (2001): Application of AFLP and ISSR techniques in detecting genetic diversity in the soybean brown stem rot pathogen *Phialophora gregata*. *Mycol. Research* 105, 936-940
- MICHELMORE, R. W., PARAN, I. und KESSELI, R. V. (1991): Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88, 9828-9832
- MICHELMORE, R. (1995): Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annual Rev. Phytopathol.* 15, 393-427
- MIHATSCH, H. und MILDENBERGER, G. (1966a): Beiträge zur Vererbung der Mehltaresistenz bei *Malus* I.: Freilandbeobachtungen an erwachsenen Sämlingen aus Kultursortenkreuzungen und freier Abblüte. *Der Züchter* 36, 1-11
- MIHATSCH, H. und MILDENBERGER, G. (1966b): Beiträge zur Vererbung der Mehltaresistenz bei *Malus* II.: Beziehungen zwischen Mehltaubefall und Witterungsverlauf. *Der Züchter* 36, 80-86
- MIHATSCH, H. und MILDENBERGER, G. (1967): Beiträge zur Vererbung der Mehltaresistenz bei *Malus* III.: Beobachtungen zu Frühselektionsproblemen. *Der Züchter* 37, 25-32
- MWANZA, E. J. und WAITHAKA, S.K. (2001): First report on powdery mildew caused by *Podosphaera leucotricha* on *Prunus africana* in Kenya. *Plant Disease* 85, 1285
- MYBURG, A. A., REMINGTON, D. M., O'MALLEY, D. M., SEDEROFF, R. R. und WHETTEN, R. W. (2001): High-throughput AFLP analysis using infrared dye-labeled primers and an automated DNA sequencer. *BioTechniques* 30, 348-357

- NEGI, M. S., DEVIC, M., DELSENY, M. und LAKSHMIKUMARAN, M. (2000): Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. *Theor. Appl. Genetics* 101, 146-152
- NORTON, R. A. (1981): Field susceptibility of apple cultivars to scab, *Venturia inaequalis*, and powdery mildew, *Podosphaera leucotricha*, in a cool, humid climate. *Fruit Varieties Journal* 35, 2-5
- OGNJANOV, V. und VUJANIC-VARGA, D. (1988): Evaluation of *Malus* germplasms for resistance to powdery mildew. *Acta Horticulturae* 224, 157-163
- OLMSTEAD, J. W., LANG, G. A. und GROVE, G. G. (2001a): A leaf disc assay for screening sweet cherry genotypes for susceptibility to powdery mildew. *HortScience* 35, 247-277
- OLMSTEAD, J. W., LANG, G. A. und GROVE, G. G. (2001b): Assessment of severity of powdery mildew infection of sweet cherry leaves by digital image analysis. *HortScience* 36, 107-111
- OLMSTEAD, J. W., LANG, G. A. und GROVE, G. G. (2001c): Inheritance of powdery mildew resistance in sweet cherry. *HortScience* 36, 337-340
- ORAGUZIE, N. C., HOFSTEE, M. E., BREWER, L. R. und HOWARD, C. (2001a): Estimation of genetic parameters in a recurrent selection program in apple. *Euphytica* 118, 29-37
- ORAGUZIE, N. C., GARDINER, S. E., BASSET, H. C. M., STEFANATI, M., BALL, R. D., BUS, V. G. M. und WHITE A. G. (2001b): Genetic diversity and relationship in *Malus* sp. Germplasm collections as determined by random amplified polymorphic DNA. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126, 318-328
- ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T. und HAYASHI, K. (1989): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, 874-879
- PARAN, I. und MICHELMORE, R. W. (1993): Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genetics* 85, 985-993
- PARISI, L., LESPINASSE, Y., GUILLAUMES, J. und KRÜGER, J. (1993): A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the  $V_f$ -gene. *Phytopathology* 83, 533-537
- PATOCCHI, A., GIANFRANCESCHI, L. und GESSLER, C. (1999a): Towards the map-based cloning of  $V_f$ : fine and physical mapping of the  $V_f$  region. *Theor. Appl. Genetics* 99, 1012-1017
- PATOCCHI, A., VINATZER, B. A., GIANFRANCESCHI, I., TARTARINI, S., ZHANG, H. B., SANSVINI, S. und GESSLER, C. (1999b): Construction of a 550 kb BAC contig spanning the genomic region containing the apple scab resistance gene  $V_f$ . *Mol. Gen. Genet.* 262, 884-891
- PAUQUET, J., BOUQUET, A., THIS, P. und ADAM-BLODON, A.-F. (2001): Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theor. Appl. Genetics* 103, 1201-1210

- PHILLIPS, K. L., JAMES, C. M., CLARKE, J. B. und EVANS, K. M. (2000): Identification of molecular markers linked to mildew resistance genes *Pl<sub>w</sub>* and *Pl<sub>d</sub>* in apple. Newsletter of the European Project FAIR-CT97-3898, No. 3
- PURVIS, A. I., PIPE, N. D., DAY, J. P., SHATTOCK, R. C. SHAW, D. S. und ASSINDER, S. J. (2001): AFLP and RFLP (RG57) fingerprints can give conflicting evidence about the relatedness of isolates of *Phytophthora infestans*. Mycol. Research 105, 1321-1330
- ROSS, I. K. (1995): Non-grinding method of DNA isolation from human pathogenic filamentous fungi using xanthogenates. BioTechniques 18, 828-830
- SAMBROOK, J. und RUSSELL, D. W. (2001): Molecular cloning: A laboratory manual, 3<sup>rd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SCHANDER, H. (1958): Untersuchung zur Entwicklung von Frühselektionsmethoden für die Apfelmehltau II: Über Frühselektion auf Resistenz gegen Apfelmehltau (*Podosphaera leucotricha* Salm.), über die Anfälligkeit von Apfelsorten und über die Vererbung der Anfälligkeit. Der Züchter 28, 105-131
- SCHEEWE, P. (1990): Entwicklung von Methoden zur *In Vitro*-Mutationsinduktion und -Selektion auf Resistenz gegen den Apfelmehltau (*Podosphaera leucotricha* [Ell. et Ev] Salm.). Dissertation, Universität Hamburg
- SCHMIDT, H. (1994): Progress in combining mildew resistance from *Malus robusta* and *Malus zumi* with fruit quality. H. Schmidt and M. Kellerhals (Eds.): Progress in temperate fruit breeding, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- SCHÜEPP, H., SIEGFRIED, W. und KELLERHALS, M. (1987): Züchtung und Mehltauanfälligkeit schorfresistenter Apfelsorten. Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau 123, 91-98
- SEEM R. C. und GILPATRICK, J. D. (1980): Incidence and severity relationships of secondary infections of powdery mildew on apple. Phytopathology 70, 851-854
- SEGLIAS-HODEL, N. (1997): Genetische Kartierung quantitativer Merkmale beim Apfel. Dissertation, ETH Zürich
- SHAN, X., BLAKE, T. K. und TALBERT, L. T. (1999): Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. Theor. Appl. Genetics 98, 1072-1078
- SIEROTZKI, H., EGGENSCHWILER, M., BOILLAT, O., McDERMOTT, J. M. und GESSLER, C. (1994): Detection of variation in virulence towards susceptible apple cultivars in natural populations of *Venturia inaequalis*. Phytopathology 84, 1005-1009
- SIEROTZKI, H. und GESSLER, C. (1998): Genetic analysis of a cross of two *Venturia inaequalis* strains that differ in virulence. J. Phytopathology 146, 515-519
- SLABAUGH, M. B., HUESTIS G. M., LEONARD, J., HOLLOWAY, J. L., ROSATO, C., HONGTRAKUL, V., MARTINI, N., TOEPFER, R., VOETZ, M., SCHELL, J. und KNAPP, S. J. (1997): Sequence-based genetic markers for genes and gene families: single-strand conformational polymorphisms for the fatty acid synthesis genes of *Cuphea*. Theor. Appl. Genet. 94, 400-408

- SPOTTS, R. A., COVEY, R. P. und CHEN, P. M. (1981): Effect of low temperature on survival of apple buds infected with the powdery mildew fungus. *HortScience* 16, 781-783
- SRISKANDARAJAH, S., SKIRVIN, R. M., ABU-QAOUD, H. und KORBAN, S. S. (1990): Factors involved in shoot elongation and growth of adventitious and axillary shoots of three apple scion cultivars *in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 65, 113-121
- SUTTON, T. B. und JONES, A. L. (1979): Analysis of factors affecting dispersal of *Podosphaera leucotricha* conidia. *Phytopathology* 69, 380-383
- TARTARINI, S., GIANFRANCESCHI, L., SANSAVINI, S. und GESSLER, C. (1999): Development of reliable PCR markers for the selection of the Vf gene conferring scab resistance in apple. *Plant Breeding* 118, 183-186
- TENZER, I. und GESSLER, C. (1994): Subdivision and genetic structure of four populations of *Venturia inaequalis* in Switzerland. H. Schmidt and M. Kellerhals (Eds.): *Progress in temperate fruit breeding*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- TENZER, I., d. IVANISEVICH, S., MORGANTE, M. und GESSLER, C. (1999): Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 89, 748-753
- THIERMANN, M., FISCHER, C., DUREL, C. E., CALENGE, F., PARISI, L. und DUNEMANN, F. (2002): QTL-Analyse von polygen vererbten Schorf- und Mehlttauresistenzen beim Apfel. *Vorträge für Pflanzenzüchtung* 54, 299-302
- THOMAS, C. M., VOS, P., ZABEAU, M., JONES, D., NORCOTT, K. A., CHADWICK, B. P. und JONES, J. D. G. (1995): Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal* 8, 785-794
- TSUYAMA, H., NAGAI, M. und AIZAWA, T. (1967): Germination of ascospore of apple powdery mildew. *Journal of the Faculty of Agriculture, Iwate University* 8, 235-243
- TURGEON, B. (1998): Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. *Annual Rev. Phytopathol.* 36, 115-137
- URBANIETZ, A., SCHMIDT, H. und DUNEMANN, F. (1998): Molecular markers in early seedling tests for scab and mildew in apples. *Acta Horticulturae* 484, 429-434
- URBANIETZ, A., DUNEMANN, F., FISCHER, C. und LESPINASSE, Y. (1999): D.A.R.E. – Ein Projekt europäischer Apfelzüchter zur Schaffung dauerhafter Resistenzen gegen Schorf und Mehltau. *Erwerbsobstbau* 41, 198-201
- VAN OOIJEN, J. W. (1999): LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species. *Heredity* 83, 613-624
- VAN OOIJEN, J. W. und VOORRIPS, R. E. (2001): JoinMap<sup>®</sup> 3.0., Software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant research international*, Wageningen, the Netherlands
- VAN TREUREN, R. (2001): Efficiency of reduced primer selectivity and bulked DNA analysis for the rapid detection of AFLP polymorphisms in a range of crop species. *Euphytica* 117, 27-37

- VISSER, T. und VERHAEGH, K. J. (1979): Resistance to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) of apple seedlings growing under glasshouse and nursery conditions. Proceedings of the Eucarpia fruit section Symposium, Angers, 3.-7. 9. 1979, 111-120
- VINATZER, B. A., ZHANG, H.-B. und SANSAVINI, S. (1998): Construction and characterisation of a bacterial artificial chromosome library of apple. Theor. Appl. Genetics 97, 1183-1190
- 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 Research 23, 4407-4414
- WARTENBERG, H. (1960): Studien am Apfelmehltau *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm. Mit Berücksichtigung einer normergisch-plasmatischen Abwehrreaktion. Phytopathologische Zeitschrift 39, 16-64
- WAY, R. D., ALDWINCKLE, H. S., LAMB, R. C., REJMAN, A., SANSAVINI, S., SHEN, T., WATKINS, R., WESTWOOD, M. N. und YOSHIDA, Y. (1990): Apples. In: J. N. Moore und J. R. Ballington jr.: Genetic resources of temperate fruit and nut crops I, Int. Soc. For Hort. Science, Wageningen. Seite 3-62
- WEBER, E. (1978): Mathematische Grundlagen der Genetik, 2. Auflage. VEB Gustav Fischer, Jena
- WILLIAMS J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI J. A. und TINGEY, S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18, 6531-6535
- WINTER, F., JANSSEN, H., KENNEL, W., LINK, H., SCHERR, F., SILBEREISEN, R. und STREIF, J. (1992): Lucas' Anleitung zum Obstbau. 31. Auflage. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- XU, M. L. und KORBAN, S. S. (2000): Saturation mapping of the apple scab resistance gene  $V_f$  using AFLP markers. Theor. Appl. Genetics 101: 844-851
- XU, X.-M. und BUTT, D. J. (1998): Effect of temperature and atmospheric moisture on the early growth of apple powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) colonies. European Journal of Plant Pathology 104, 133-140
- ZELLER, W. (1989): Zum Stand der Forschung und Bekämpfung des Apfelmehltaus. Nachrichtenblatt deutscher Pflanzenschutzdienst 41, 19-22

## 7 Anhang

### 7.1 Testsortiment zur Selektion neuer Resistenzquellen

#### 7.1.1. Herkunft und Befallserwartung

Genotyp	Herkunft der Veredlungsreiser	Erwarteter Resistenzgrad *
---------	-------------------------------	----------------------------

#### Kultursorten

Alkmene	Dresden-Pillnitz	Wenig anfällig
Carola	Dresden-Pillnitz	widerstandsfähig
Danziger Kant	Dresden-Pillnitz	unanfällig
Delicious	East Malling	Wenig anfällig
Democrat	East Malling	Wenig bis mittel anfällig
Dülmener Rosenapfel	Dresden-Pillnitz	widerstandsfähig
Glockenapfel	Dresden-Pillnitz	Wenig anfällig
Laxton's Superb	East Malling	Ziemlich anfällig
Lord Lambourne	Dresden-Pillnitz	Wenig bis mittel anfällig
Maiden's Blush	East Malling	Wenig anfällig
Melba	East Malling	Gering bis mittel anfällig
Peasgood's Nonesuch	East Malling	Wenig anfällig
Pi-AS-22/17	Dresden-Pillnitz	widerstandsfähig
Rewena	Dresden-Pillnitz	resistent
Roter Berlepsch	Hannover	Wenig empfindlich
Rote Sternrenette	Hannover	'robust'
Stirling Castle	East Malling	unanfällig
Tydeman's Late Orange	East Malling	mittel bis wenig anfällig
Worcester	East Malling	mittel anfällig

#### Anfällige Kontrollsorten

Jonathan	Ahrensburg	anfällig
Gibb's Golden Gage	Dresden-Pillnitz	hoch anfällig

#### Schorfresistente Sorten

Discovery	East Malling	wenig anfällig
TN 10-8	Angers	gering anfällig
Durello di Forli	Bologna	anfällig
Fiesta	East Malling	anfällig
Prima	Dresden-Pillnitz	relativ widerstandsfähig

#### Wildarten oder deren Derivate

Malus robusta persicifolia	Dresden-Pillnitz	resistent (PI <sub>1</sub> )
Malus zumi calocarpa	Dresden-Pillnitz	resistent (PI <sub>2</sub> )
Malus hupehensis (Pillnitz)	Dresden-Pillnitz	resistent
E 334-62 (M. hupehensis)	East Malling	resistent
89/9-4 (White Angel-Sämling)	Ahrensburg	resistent (PI <sub>w</sub> )
E 295-4 (White Angel-Sämling)	East Malling	resistent (PI <sub>w</sub> )
D 12 (Original)	Ahrensburg	resistent (PI <sub>D</sub> )
A 871-14 (D12-Sämling)	East Malling	resistent (PI <sub>D</sub> )
Mildew Immune Seedling	Angers	resistent
Malus baccata ‚Jackii‘	Dresden-Pillnitz	resistent
Malus baccata mandshurica	Ahrensburg	resistent
Malus trilobata	Dresden-Pillnitz	resistent
Malus coronaria	Dresden-Pillnitz	resistent
Malus sylvestris	Dresden-Pillnitz	resistent

\* = aus der Literatur zusammengetragen

## 7.1.2. Befallserfassung an verschiedenen Standorten

<b>Genotyp</b>	<b>Ahrens- burg</b>	<b>Dresden</b>	<b>Wädenswil</b>	<b>East Malling</b>	<b>Angers</b>
Alkmene	anfällig	anfällig	anfällig	Befall	Befall
Carola	anfällig	anfällig	anfällig	gesund	Befall
Danziger Kant	anfällig	anfällig	anfällig	gesund	Befall
Delicious	anfällig	anfällig	anfällig	gesund	Befall
Democrat	feldresistent	feldresistent	feldresistent	gesund	Befall
Dülmener Rosenapfel	resistent	resistent	resistent	gesund	gesund
Gibbs Golden Gage	sehr anfällig	sehr anfällig	sehr anfällig	anfällig	anfällig
Glockenapfel	feldresistent	anfällig	anfällig	Befall	gesund
James Grieve	anfällig	anfällig	feldresistent	Befall	Befall
Jonathan	sehr anfällig	sehr anfällig	anfällig	anfällig	gesund
Laxton's Superb	anfällig	anfällig	anfällig	gesund	Befall
Lord Lambourne	anfällig	anfällig	anfällig	Befall	gesund
Maiden's Blush	feldresistent	feldresistent	feldresistent	gesund	Befall
Melba	feldresistent	resistent	feldresistent	gesund	Befall
Peasgood's Nonsuch	feldresistent	feldresistent	feldresistent	gesund	gesund
Pi-AS-22/17	feldresistent	feldresistent	resistent	gesund	gesund
Rewena	anfällig	anfällig	anfällig		gesund
Roter Berlepsch	feldresistent	anfällig	anfällig	Befall	gesund
Rote Sternrenette	resistent	resistent	resistent	gesund	gesund
Stirling Castle	feldresistent	anfällig	anfällig	Befall	gesund
Tydemans Late Or.	anfällig	anfällig	anfällig	gesund	Befall
Worcester	anfällig	feldresistent	anfällig	gesund	Befall
Discovery	resistent	feldresistent	resistent	gesund	gesund
TN10-8	feldresistent	anfällig	resistent	gesund	gesund
Durello di Forli	anfällig	feldresistent	anfällig	Befall	
Fiesta	anfällig	anfällig	anfällig	Befall	Befall
Prima	anfällig	feldresistent	feldresistent	Befall	gesund
M. robusta persicifolia	resistent	resistent	resistent	gesund	gesund
M. zumi calocarpa	anfällig	resistent	resistent	gesund	gesund
White Angel (89/9-4)	anfällig	feldresistent	anfällig	Befall	gesund
White Angel (E295-4)	resistent			gesund	
D12 (Original)	resistent	resistent	resistent	gesund	gesund
D12 (A871-14)	resistent				
Mild.Imm.Seedling	resistent	resistent	resistent	gesund	
M. hupehensis (E334-62)	resistent	resistent		gesund	gesund
M. hupehensis (745)	resistent	resistent			
M sargentii		resistent	resistent	gesund	gesund
M. sieboldii		resistent	resistent		Befall
M. baccata 'Jackii'	resistent		resistent		
M. baccata mandshurica	resistent			gesund	gesund
M. trilobata (428)	resistent				

## 7.2 Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

### 1x MDE-Gel (20 ml)

7 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
1,2 ml 10x TBE Long Run Puffer  
10 ml MDE-Lösung (BME, Rockland, Me, USA)  
1,7 ml Glycerin (60%)  
100 µl Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %)  
12,5 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)

### 1x RL-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7.5  
10 mM MgAc  
50 mM KAc  
5 mM Dithioeitol

### 1x TAE-Puffer

40 mM Tris-base  
1 mM Na-EDTA  
pH 8.0 mit konzentrierter Essigsäure einstellen

### 1x TBE-Puffer

89 mM Tris-base  
88 mM Borsäure  
2 mM Na-EDTA

### 1x Williams-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8.3  
50 mM KCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,001% Gelatine

### 2x CTAB-Puffer

2 % Cetyltrimethylammoniumbromid  
20 mM Na-EDTA, pH 8.0  
0,1 M Tris, pH 8.0  
1,4 M NaCl  
2 % PVP

### 10x TBE Long Run Puffer

1,34 M Tris-base  
0,45 M Borsäure  
25 mM Na-EDTA

AFLP-Dye

98 % Formamid  
10 mM EDTA, pH 8.0  
0,025 % Bromphenolblau  
0,025 % Parasosanilin-Chlorid

Freezing Broth (1 Liter)

10 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
6,3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,45 g Na-Citrat  
0,09 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
0,9 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
1,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
44 ml Glycerin

Autoklavieren

LB-Medium (1 Liter)

10 g Select Pepton 140  
5 g Hefeextrakt  
10 g NaCl  
pH 7.0 einstellen  
Für festes Medium 15 g Agar zufügen

Autoklavieren

PEX-Extraktionspuffer

100 mM Tris, pH 7.5  
12,5 mM Kaliumethylxanthogenat  
10 mM EDTA, pH 8.0  
700 mM NaCl

Polyacrylamid-Gel (25 ml)

8 M Harnstoff  
6 % Acrylamid-Stammlösung (40 %, Roth, Karlsruhe)  
1x TBE Long Run Puffer  
0,05 % Ammoniumpersulfat  
15 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Polyacrylamid-Sequenz-Gel (40 ml)

8M Harnstoff  
8 % RapidGel XL-40%-Solution (USB, Cleveland, Ohio, USA)  
1x TBE Long Run Puffer  
0,01 % DMSO  
0,07 % Ammoniumpersulfat  
40 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl  
1 mM EDTA, pH 8.0

SOC-Medium (1 Liter)

20 g Trypton

5 g Hefeextrakt 10 ml NaCl (1 M)

2,5 ml KCl (1 M)

pH 7.0 einstellen

Autoklavieren

10 ml MgCl<sub>2</sub>-Stock (2 M)

Sterilfiltriert zugeben

10 ml Glucose (2 M)

Sterilfiltriert zugeben

SSCP-Dye

95 % Formamid

0,01 M NaOH

0,05 % Xylencyanol

0,05% Bromphenolblau

7.3 Nährmedien zur *in vitro*-Kultur

	M2	M2-00	M7
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 ppm	1650 ppm	1650 ppm
KNO <sub>3</sub>	1900 ppm	1900 ppm	1900 ppm
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	440 ppm	440 ppm	440 ppm
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	370 ppm	370 ppm	370 ppm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 ppm	170 ppm	170 ppm
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	16,9 ppm	16,9 ppm	16,9 ppm
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	8,6 ppm	8,6 ppm	8,6 ppm
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 ppm	6,2 ppm	6,2 ppm
NaFeEDTA	37,5 ppm	37,5 ppm	37,5 ppm
KJ	0,83 ppm	0,83 ppm	0,83 ppm
NaMoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25 ppm	0,25 ppm	0,25 ppm
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025 ppm	0,025 ppm	0,025 ppm
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025 ppm	0,025 ppm	0,025 ppm
Thiamin-HCl	0,1 ppm	0,1 ppm	0,1 ppm
Nicotinsäure	0,5 ppm	0,5 ppm	0,5 ppm
Pyridoxin	0,5 ppm	0,5 ppm	0,5 ppm
Glycin	2,0 ppm	2,0 ppm	2,0 ppm
myo-Inositol	100 ppm	100 ppm	100 ppm
BAP	1 ppm	0	1 ppm
IBA	1 ppm	0	0
NAA	0	0	0,1 ppm
2iP	0	0	3 ppm
Sorbitol	30%	30%	30%
Bitek-Agar	8%	7%	8%
pH	5.8	5.8	5.8

## 7.4 Inokulationstests

Einsporisolat	Ahr-11	Ahr-11	Ahr-11	GB-43 K2	GB-43 K2	Greece	Greece
	4.10.01 7 Sp/mm <sup>2</sup>	23.11.01 3 Sp/mm <sup>2</sup>	11.1.02 4 Sp/mm <sup>2</sup>	19.7.01 5 Sp/mm <sup>2</sup>	26.7.01 5 Sp/mm <sup>2</sup>	26.7.01 4 Sp/mm <sup>2</sup>	20.9.01 7 Sp/mm <sup>2</sup>
Alkmene	-	-	+	-	+	+	+
Carola	-	-		-	-	+	+
Danziger Kant	-		+	-	+	+	+
Delicious	-	+	+	-	+	-	+
Democrat	-	- -	-	+	-	-	+
Dülmener Rosenapfel	-	-	-		-	-	+
James Grieve	-			-	-	-	+
Laxton's Superb	-		-	-	-	-	-
Lord Lambourne	-			-	+	-	-
Maiden's Blush	-			+	-	-	-
Melba				+			+
Pi-AS-22/17	-	-	-	-	-	+	+
Rewena	-			-	+	+	+
Roter Berlepsch	+			-	+	-	+
Rote Sternrenette				-	+	-	-
Stirling Castle		-	-	-			+
Tydemans Late Orange	+	- -	+	-	-	-	+
Worcester	-			-	-	-	-
Jonathan	+	+	- -	-	+	-	+
Gibb's Golden Gage	+	+	+	-	+	+	+
Discovery	-	- -	-	-		-	-
TN 10-8	+			-	+	-	+
Durello di Forli	-		-	+	+	+	+
Fiesta				-	-	+	+
Prima	-		-	+	+	+	+
Malus robusta persicifolia					+	+	
Malus zumi calocarpa	-		-	-	-	-	-
Malus hupehensis (Pillnitz)	-			+	+	-	-
E 334-62 (M. hupehensis)	-						-
E 295-4 (White Angel)			-	-	+	-	
D 12 (Original)	-	-	-	-	-	-	-
Mildew Immune Seedling	-	-		-	-	-	-
Malus baccata mandshurica	-			-	+	-	
Malus trilobata	-	-	-	-	-	-	-
Malus coronaria					-	-	
Malus sylvestris				-	+	+	+

Einsporisolat	Italy	Italy	Italy	France-T6	France-T6	France-T6	France-T4
	20.9.01 5 Sp/mm <sup>2</sup>	20.9.01 7 Sp/mm <sup>2</sup>	14.12.01 7 Sp/mm <sup>2</sup>	20.8.01 6 Sp/mm <sup>2</sup>	20.8.01 6 Sp/mm <sup>2</sup>	20.9.01 8 Sp/mm <sup>2</sup>	11.1.02 4 Sp/mm <sup>2</sup>
Alkmene	-	+	- - -	+	+	+	+
Carola	-	+		+	+	-	
Danziger Kant	+	-		+	+	-	-
Delicious	+	+	- -	+	+	+	-
Democrat	+	+	- -	-	+	+	+
Dülmener Rosenapfel	+	-	-	+	-	-	-
James Grieve	+	+		-	-	-	
Laxton's Superb	+	-		-	-	-	-
Lord Lambourne	-	+	- -	-	+	-	
Maiden's Blush	-						
Melba	+	-		+	+	+	
Pi-AS-22/17	+	+	- -	+	+	+	-
Rewena	-	-		+	+	+	
Roter Berlepsch	+	+		-	+	+	
Rote Sternrenette	+	-		+	+	+	
Stirling Castle	-	-		-	-	-	+
Tydeman's Late Orange	+	+	- -	+	+	+	+
Worcester	-	-		+	+	-	
Jonathan	+	+		-	+	+	+ -
Gibb's Golden Gage	+	+	- -	+	+	+	+ +
Discovery	+	+		-	-	-	-
TN 10-8	+	+		-	-	+	
Durello di Forli	+	+		-	+	+	+
Fiesta	-	-		-	+	+	
Prima	+	+		+	+	+	+
Malus robusta persicifolia				-	-		
Malus zumi calocarpa	-	-				-	-
Malus hupehensis (Pillnitz)	-	-		-	-	-	
E 334-62 (M. hupehensis)	-	-		-	-	-	
E 295-4 (White Angel)				-	-		-
D 12 (Original)	-	-		-	-	-	-
Mildew Immune Seedling	-	-	- -	-	-	-	
Malus baccata							
Malus trilobata	-	-		-		-	-
Malus coronaria				-	-		
Malus sylvestris	+	+		+	+	+	









	Bonitur	Bonitur	Bonitur	Marker	Marker	CAPS	Marker	Marker	Marker	Marker	Marker	Marker
99/2	17.09.99	08.06.00	27.06.01	AT20	AFLP 1	AU1a	AFLP 2	AFLP 3	AFLP 4	AFLP 5	AFLP6	AFLP 7
203	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
204	3	5	3	0		0						
205	3	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
206	4	2	3	0								
207	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
208	2	0	2	1		1						
209	4	0	3	0		0						
210	4	3	3	0		0						
211	4	5	5									
212	2	1	2	1		1						
213	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
214	2	1	3									
215	3	2	3									
216	0	0	3	1	1	1	1	1	1	1	0	1
217	2	3	3	0								
218	2	1	2									
219	1	1	3									
220	3	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
221	3	3	4	0	0	0	0	0	0	0		0
222	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
223	2	0	2	1		1						
224	3	2	3	0		0						
225	4	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1
226	2	2	4									
227	3	2	3	0		0						
228	3	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
229	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
230	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1	0	1
231	2	1	3									
232	3	3	3	0		0						
233	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
234	4	5	4									
235	0	1	2	1		1						
236	4	5	3									
237	2	2	2	0		0						
238	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1
239	0	0	1	1		1						
240	3	3	3									
241	1	0	2	1		1						
242	3	4	2									
243	0	0	4									
244	0	0	4									
245	0	0	2									
246	3	0	4	0		1						
247	3	3	3	0		0						
248	3	2	3	0		0						
249	2	3	5									
250	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
251	0	1	0	0		0						
252	2	1	2									
253	3	3	3	0	0	0	0	0	1	1	0	0

	Bonitur	Bonitur	Bonitur	Marker	Marker	CAPS	Marker	Marker	Marker	Marker	Marker	Marker
99/2	17.09.99	08.06.00	27.06.01	AT20	AFLP 1	AU1a	AFLP 2	AFLP 3	AFLP 4	AFLP 5	AFLP6	AFLP 7
254	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
255	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
256	1	0	1	0		1						
257	1	0	0	0		1						
258	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0
259	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0		0
260	1	0	2	1		1						
261	1	0	2	1		1						
262	0	0	2									
263	5	4	3	1		1						
264	2	1	3									
265	3	3	3		0	0	0	0	0	0	0	0
266	2	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1
267	0	0	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
268	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
269	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270	2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
271	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0
272	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
273	0	0	0									
274	3	2	3									
275	3	4	4	0								
276	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
277	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
278	3	3	3	0								
279	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
280	3	3	3	1								
281	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
282	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
283	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
284	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
285	3	3	3	0								
286	5	4	4	1	0	0	1	0	0	0	0	0
287	3	3	2									
288	5	5	tot									
289	5	5	3	0		0						
290	4	5	3									
291	3	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
292	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
293	0	1	1	1		1						
294	3	3	3	0	0	0	0	0	1	1	0	1
295	2	0	2	0		1						
296	0	0	2	1		1						
297	0	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
298	0	2	0									
299	1	2	2									
300	1	0	0									
301	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1
302	2	3	3									
303	1	0	2	1		1						
304	0	1	2	1		1						

	Bonitur	Bonitur	Bonitur	Marker	Marker	CAPS	Marker	Marker	Marker	Marker	Marker	Marker
99/2	17.09.99	08.06.00	27.06.01	AT20	AFLP 1	AU1a	AFLP 2	AFLP 3	AFLP 4	AFLP 5	AFLP6	AFLP 7
305	2	2	1									
306	3	2	1	0		0						
307	2	2	4									
308	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
309	2	0	2	1		1						
310	2	2	2									
311	3	4	3	0	0	0	0	0	0	0		0
312	0	2	3	1		1						
313	3	1	3									
314	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
315	1	0	1	1		1						
316	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
317	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0
318	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0
319	3	2	3	0		1						
320	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1
321	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
322	3	2	3									
323	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
324	3	0	2	1		0						
325	3	5	4									
326	3	0	3	0		0						
327	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
328	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1
329	0	0	3	1	1	1	1	1	0	0	1	0
330	3	4	3	0	0	0	0	0	1	1	0	1
331	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1	0	1
332	2	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
333	2	0	2									
334	4	tot	tot									
335	4	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
336	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
337	3	2	4	0		0						
338	3	3	4	0		0						
339	2	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1
340	1	0	2	1		1						
341	4	3	4									
342	2	0	3									
343	3	2	3	0		0						
344	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
345	3	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1
346	4	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
347	4	4	5									
348	5	3	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0
349	3	2	3									
350	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
351	2	0	3	0		0						
352	3	2	3									
353	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1
354	2	0	3			2						
355	3	3	4	0		0						

	Bonitur	Bonitur	Bonitur	Marker	Marker	CAPS	Marker	Marker	Marker	Marker	Marker	Marker
99/2	17.09.99	08.06.00	27.06.01	AT20	AFLP 1	AU1a	AFLP 2	AFLP 3	AFLP 4	AFLP 5	AFLP6	AFLP 7
356	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
357	5	5	5									
358	3	3	3	0								
359	0	0	2	1	1	1	1	1	0	0	1	0
360	3	2	3									
361	5	5	4									
362	3	0	3	0		0						
363	2	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
364	3	2	3									
365	3	2	3	0		0						
366	2	0	1									
367	5	2	3	0		0						
368	0	2	4	1		0						
369	3	0	5									
370	3	2	3	0		0						
371	3	0	1									
372	2	0	3								0	1
373	4	2	4	0		0						
374	3	3	3	0		0					0	1
375	3	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
376	3	0	4	0		0						
377	0	0	2	1	1	1	1	1	0	0	1	1
378	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
379	4	5	2									
380	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
381	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
382	3	3	3	0		0						
383	2	1	1	0		0						
384	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
385	2	2	2	0		0						
386	2	1	0	1		1						
387	1	1	2	1		1						
388	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
389	4	tot	tot									
390	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
391	4	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1
392	3	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
393	0	1	4	0		0						
394	3	3	3	0		0						
395	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0
396	3	3	2	0		0						
397	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
398	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
399	3	3	2	0		0						
400	1	0	2	1	1	1	1	1	0	0	1	0
401	4	3	3	0		0						
402	0	0	3	1		1						
403	3	3	3	0		0						
404	0	0	2	1		1						
405	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
406	0	0	1	1		1						



## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Professor Grunewaldt für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit bedanken und bei Herrn Professor Schönherr für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Frank Dunemann für die Überlassung des Themas und für seine Bereitschaft, mir in allen Stadien der Arbeit mit Rat und Tat zur Verfügung zu stehen.

Frau Dir. u. Prof. Dr. habil. Viola Hanke danke ich herzlich für die Überlassung des *in vitro*-Materials von 'Gibb's Golden Gage' inklusive Rezepten für das Kulturmedium.

Regina Illgner, Inke Stange und Manfred Radies möchte ich für ihre praktische Hilfe danken, ebenso wie den LTA-Schülern Irena Kröger, Anne Adzersen, Frank Seel, Solveig Fedkenhauer, Katrin Sabin und Janina Köppel, die im Rahmen ihrer praktischen Ausbildung bei mir tätig waren.

Für ihre konstruktive Kritik und Diskussionsbereitschaft gilt mein Dank weiterhin Frau Professor Hanna Schmidt, Dr. Marcus Linde, Dr. Helgard Kaufmann, Frau Lore Mattiesch, Dr. habil. Thomas Debener, Dr. Andrea Dohm, Hartmut Blank und Dr. Barbara Merkt.

Ich widme diese Arbeit dem Gedenken meines Vaters, der die Fertigstellung leider nicht mehr erleben durfte.

# Lebenslauf

## **Persönliche Daten:**

Name: Annette Urbanietz  
Geboren am: 11.01.1971  
Geburtsort: Hannover

## **Schulbildung:**

09/1977 – 06/1981      Grundschule Bennigsen  
08/1981 – 07/1983      Orientierungsstufe Nord, Springe  
09/1983 – 05/1990      Otto-Hahn-Gymnasium, Springe

## **Hochschulausbildung:**

10/1990 – 07/1996      Studium der Gartenbauwissenschaften am  
Fachbereich Gartenbau der Universität  
Hannover  
10/1992 – 09/1993      Studiengebundenes Praktikum in der Baumschule  
Wassermann, Weetzen  
05/1995 – 11/1995      Praktische Diplomarbeit am Institut für Zier-  
pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt  
für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in  
Ahrensburg

## **Berufliche Tätigkeit:**

10/1996 – 12/1997      Anstellung als Gärtner-Gehilfin in der Baumschule  
Wassermann, Weetzen  
04/1998 – 04/2002      Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für  
Zierpflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt  
für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in  
Ahrensburg