



DGG-Proceedings, Vol. 6, 2016

Short Communications of the WeGa Network 2010-2015

Peer Reviewed

Editorial Board

Dirksmeyer, Walter *Braunschweig*
Flachowsky, Henryk *Dresden*
Förster, Nadja *Berlin*
Geyer, Martin *Potsdam*
Hardeweg, Bernd *Hannover*
Mibus-Schoppe, Heiko *Geisenheim*
Michaelis, Gerlinde *Bad-Zwischenahn*
Rath, Thomas (Editor in Chief) *Osnabrück*
Richter, Ellen *Braunschweig*
Thomas, Jens *Osnabrück*
Winkelmann, Traud *Hannover*
Zinkernagel, Jana *Geisenheim*

Helgard Kaufmann, Juliane Geike, Thomas Debener*

Mehltauresistenz durch innovative "Reverse Genetics"-Strategien bei *Rosa*

*Corresponding Author:

Thomas Debener
Leibniz Universität Hannover,
Institut für Pflanzengenetik, Abteilung Molekulare Pflanzenzüchtung
30419 Hannover, Germany

Email: debener@genetik.uni-hannover.de

Mehltauresistenz durch innovative "Reverse Genetics"-Strategien bei *Rosa*

Helgard Kaufmann, Juliane Geike, Thomas Debener

Leibniz-Universität Hannover, Institut für Pflanzengenetik, Abteilung Molekulare
Pflanzenzüchtung

1. Einleitung, Stand des Wissens, Zielsetzung

Der Echte Mehltau ist eine der am weitesten verbreiteten Pilzkrankheiten der Rose. Die Krankheit wird durch den Ascomyceten *Podosphaera pannosa* (Wallr.:Fr.) de Bary hervorgerufen. Er gehört zur Familie der Erysiphaceae und ist mit anderen Mehltauerregern verwandt. *Podosphaera pannosa* erweist sich gegenüber allen Bekämpfungsmaßnahmen als sehr anpassungsfähig. Die Rassenbildung in Kombination mit einer raschen Verbreitung durch Wind führt zur explosionsartigen Ausbreitung neu entstandener Erregerrassen (Horst und Cloyd 2007). Deshalb sind dauerhafte und breit wirkende Resistenzen ein wichtiges Ziel in der Rosenzüchtung.

In der Gerste wurden zuerst rezessive, rassenunspezifisch wirkende Resistenzen (mildew resistance locus o, *mlo*) gegen den Gerstenmehltau entdeckt (Jorgensen 1977). Die Isolierung des *MLO*-Gens aus Gerste führte zur Charakterisierung eines membranständigen Proteins (Büschges et al. 1997). Der Gerstenmehltau benötigt es offenbar, um den Zelltod der infizierten Zelle zu unterdrücken und Haustorien in der Epidermis auszubilden. Ist das Gen mutiert, so ist die Pflanze gegen alle Rassen des Erregers resistent. Das *MLO*-Gen gehört zu einer Genfamilie. In den vollständig sequenzierten Genomen von *Arabidopsis* und Reis wurden 15 bzw. 12 Familienmitglieder charakterisiert (Panstruga 2005). In *Arabidopsis*, Tomate und kürzlich auch in Erbse konnten ebenfalls *mlo*-Mutanten detektiert werden, die eine breite rassenunspezifische Resistenz aufweisen. Dabei sind in *Arabidopsis* für die vollständige Resistenz Mutationen von drei Mitgliedern der Genfamilie nötig, während bei Tomate und Erbse wie bei der Gerste ein Einzelgen verantwortlich ist (Consonni et al. 2006, Bai et al. 2008, Pavan et al. 2011). Die für die Mehltau-Anfälligkeit verantwortlichen Mitglieder der *MLO*-Genfamilie ähneln sich und gehören zu einer phylogenetischen Gruppe (Feechan et al. 2008). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Interaktion zwischen Mehltaupilz und *MLO* im Pflanzenreich hoch konserviert ist und dass die *MLO*-Gene auch in anderen Pflanzen einen Weg zur Erzeugung breit wirksamer Resistenz bieten (Pavan et al. 2010).

Reverse Genetik ist eine mögliche Strategie, um in Pflanzen, für die keine zu Resistenz führenden *MLO*-Defekt-Mutanten bekannt sind, gezielt solche zu suchen. Dies kann in natürlichen Populationen erfolgen, wenn, wie bei der Rose, eine hohe genetische Diversität verfügbar ist (Debener und Linde 2009). Mit den neuen Möglichkeiten der Hochdurchsatz-Sequenzierung, die seit einigen Jahren zur Verfügung stehen, können große Pflanzenzahlen mit vertretbarem Aufwand analysiert werden (Marroni et al. 2011), selbst wenn, wie im Fall der Rose, keine Genomsequenz verfügbar ist.

Deshalb wurden für die Rose analog zu den Systemen in Gerste und *Arabidopsis* *MLO*-Gene isoliert (Kaufmann et al. 2012), um dann ein breit angelegtes Screening natürlich vorkommender Defektmutanten durchzuführen.

2. Material und Methoden

DNA-Isolierung und PCR-Amplifikation. DNA aus getrockneten, jungen Blättern wurde mit dem *Nucleospin 96 Plant II* DNA-Extraktionskit (Macherey-Nagel, www.mn-net.com) isoliert. DNA-Amplifikationen erfolgten in 25µl Reaktionsvolumen mit 40 ng DNA, jeweils gemischt aus zwei Rosenproben. Für *MLO 2, 3* und *4* wurde *Takara Prime Star HS* Polymerase (Takara, www.clonetech.com) im Reaktionsansatz entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet, für *MLO1* wurde *LongAmp Taq* DNA Polymerase (New England Biolabs, www.neb.com) eingesetzt. Gleiche Mengen der PCR-Produkte aus 20 Reaktionen wurden gemischt und mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Quiagen, www.qiagen.com) aufgereinigt. Aus Ampliconmischungen aller 4 Gene in insgesamt 24 Pools wurden durch die GATC Biotech AG (Konstanz) Libraries zur Sequenzierung erstellt und mit dem Illumina HiSeq 2000 als 100bp single reads sequenziert.

Datenanalyse. Mit dem Programm *CLC-Genomic Workbench 6.5.1* (www.clcbio.com) wurden die Sequenzen zunächst durch "Read-mapping" mit Standardeinstellungen auf der Referenzsequenz der Gene *MLO 1, 2, 3* und *4* platziert. Nach Anpassung von größeren Deletionen/Insertionen durch "Local realignment" erfolgte die Suche nach Sequenzvarianten durch "Quality-based Variant Detection" mit den folgenden Abweichungen von den Standardeinstellungen: Minimum neighborhood quality 30, Minimum central quality 30, Minimum coverage 1600, Minimum variant frequency 0,3%. Schließlich wurden durch die Analyse "Functional Consequences, Amino Acid Changes" Veränderungen der Proteinsequenzen identifiziert.

Einzelanalyse von Mutationen. Basierend auf den in der Datenanalyse mit *CLC Genomic Workbench* erhaltenen Sequenzen aus dem Bereich interessanter Sequenzvarianten wurden mit *Primer 3* (bioinfo.ut.ee) PCR-Primer zur Amplifikation dieser Bereiche entworfen und in allen 40 DNAs eines Pools getestet, um die Variante zu verifizieren und einer Rosensorte zuzuordnen.

3. Ergebnisse

Die Isolierung und Charakterisierung von *MLO*-Genen der Rose wurde bereits beschrieben (Kaufmann et al 2012). Vier Rosen-*MLO* Gene (*RhMLO 1, 2, 3* und *4*; Genbank Accessionen JX847131–JX847134) besitzen hohe Sequenzähnlichkeit zu den für die Mehltauanfälligkeit verantwortlichen Genen aus *Arabidopsis*, Tomate und Erbse und sind deshalb Kandidatengene für den Reverse-Genetik-Ansatz der Mutantensuche.

Genstruktur von RhMLO1, 2, 3 und 4. Für diese vier Gene wurde deshalb anhand von acht Rosengenotypen die Genstruktur mit dem Vorkommen konservierter, als Primerbindungsstellen geeigneter Bereiche untersucht. Die Sequenzanalyse ergab für alle vier Gene einen Aufbau aus 15 Exons, die sich bei *MLO2* und *MLO4* über etwa 3,5 kB, bei *MLO1* über 6,5 kB und bei *MLO3* entweder über 3,8 kB oder über 9,5 kB erstrecken. Diese Größenvariation beruht auf Unterschieden in der Größe einzelner Introns, bei *MLO3* zusätzlich auf der Insertion eines Transposons. Die kodierende Sequenz (Exons) liegt für

alle vier Gene bei etwa 1,8 kB. Es konnten Primerbindungsstellen identifiziert werden, die Amplifikationen des proteinkodierenden Bereichs für alle getesteten Genotypen für jedes der vier Rosen-*MLO*-Gene erlauben (Kaufmann et al. 2012).

Next-Generation-Sequenzierung von MLO1, 2, 3 und 4. Mit einer Strategie, die als "Next-Generation Ecotilling" bezeichnet wurde (Marroni et al. 2011), erfolgte die Suche nach seltenen Defektmutationen der *MLO*-Gene in Rosen. Als Genpool für die natürlichen Varianten wurden 960 Rosensorten und -arten in deutschen Rosarien gesammelt. Dabei wurde darauf geachtet, ein breites Sortenspektrum (z.B. in Bezug auf Züchter, Jahr der Züchtung) abzudecken. Genomische Amplicons des proteinkodierenden Bereichs wurden in 24 Pools aus jeweils 40 Genotypen zusammengefasst. Um möglichst gleichmäßige Mengenanteile aller Allele zu erhalten, erfolgte die Mischung der Proben erst nach der PCR-Reaktion. Es wurden insgesamt 268 Millionen Illumina-Sequenzen von 101 Basen Länge erhalten, wobei die einzelnen Pools zwischen 7 Millionen und 25 Millionen Sequenzen enthielten. Zwischen 82% und 92% der Sequenzen konnten auf die Referenzsequenz der *MLO*-Gene 1, 2, 3 und 4 aligniert werden. Damit ergab sich eine durchschnittliche Abdeckung zwischen 16000 und 60000-fach pro Gen für die einzelnen Pools. Für jedes der vier Gene wurden zahlreiche Sequenzvarianten gefunden. Zwischen 70 (*MLO2*) und 150 Varianten (für *MLO1* und *MLO3*) führten zu Aminosäureaustauschen.

Identifizierung von putativen Defektallelen. Defektallele können entweder durch Störungen des Protein-Leserasters durch Insertionen bzw. Deletionen oder durch Punktmutationen, die Stopp-Codons verursachen, entstehen. Entsprechende Mutationen wurden in der Sequenzanalyse mit *CLC Genomic Workbench* direkt detektiert. Zusätzlich wurde, basierend auf einer vergleichenden Sequenzanalyse aller bekannten *MLO*-Orthologen und der zahlreichen Defektallele aus Arabidopsis und Gerste (Consonni et al. 2006, Reinstädler et al. 2010) ein Katalog der absolut konservierten Aminosäurepositionen erstellt (Daten nicht gezeigt). Die Aminosäureaustausche für die Rosen-*MLOs* in diesen konservierten Positionen wurden erfasst. Entsprechende Mutationen wurden durch geeignete PCR-Tests überprüft und einem Rosengenotyp zugeordnet. Dabei wurden zwei putative Defektallele für *MLO2*, drei für *MLO4*, sowie ein putatives Defektallel für *MLO3* gefunden. In Tabelle 1 sind diese Mutationen detailliert dargestellt.

4. Diskussion

Auf *MLO*-Genen basierende Resistenz gegen den Echten Mehltau hat sich bereits in einer Reihe von Pflanzenarten als ein geeigneter Weg zu dauerhaftem und breit wirksamem Schutz erwiesen (Jorgensen 1977, Bai et al. 2008, Pavan et al. 2011). Für Rosen sind *MLO*-Defektmutanten, die zu Funktionsverlust und damit zu Mehltaresistenz führen, nicht bekannt. Aufgrund ihrer Heterozygotie ist die spontane Entstehung solcher (homozygoter) Mutanten extrem unwahrscheinlich. Jedoch ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sich mutierte Allele unbemerkt im Genpool halten.

Durch Next-Generation-Sequenzierung von *MLO*-Amplicons wurde deshalb gezielt nach solchen Defektallelen gesucht. Die Entdeckung von ein bis drei mutierten Allelen in knapp 1000 analysierten Sorten für die Rosengene *MLO* 2, 3 und 4 belegt das Potential der

„Reverse-Genetics“-Strategie. Für *MLO1* konnte trotz hoher Sequenzvariabilität noch keine Mutante gefunden werden, jedoch besteht die Möglichkeit, weitere Sorten aus dem immensen verfügbaren Angebot zu testen.

Die biologische Wirkung der entdeckten *MLO*-Mutationen auf die Genfunktion kann bisher nicht beurteilt werden. Hierzu sind homozygote Mutanten notwendig.

5. Schlussfolgerung

Die hier beschriebene Suche nach Defektmutationen in *Mildew Resistance Locus O* Genen der Rose ist ein erfolgversprechendes Beispiel für einen auf ein Kandidatengen gerichteten „Reverse-Genetics“-Ansatz. Sie zeigt einen Weg, der auch für polyploide „Nicht-Modell-Pflanzen“ ohne Kompletsequenz des Genoms beschränkt werden kann. Für die züchterische Nutzung könnten *MLO* Defektallele durch Markerselektion schrittweise angereichert (Duplex, Triplex und Quadruplextypen) und dadurch Eliteklone erzeugt werden, deren Nachkommen eine hohe Rate an mehltreueren Genotypen aufweisen.

Tab. 1: Mutationen in *RhMLO* 2, 3 und 4 (Genbank JX847132–JX847134) mit möglicher Auswirkung auf die Proteinfunktion

Gen und Position	Art der Mutation	Wildtyp	Mutante	Effekt
MLO2 198	SNV	G	A	Veränderung einer Splice-Stelle
MLO2 3616..3637	Deletion	12N	--	Deletion von vier Aminosäuren
MLO3 3123	SNV	G	C	Mutation in konservierter Position der Calmodulin Binding Site
3432..3433	Deletion	TC	--	Vorzeitiger Stopp
MLO4 277^278	Insertion	--	ATAT	Vorzeitiger Stopp
1604	SNV	A	G	Aminosäureaustausch in konservierter Position
2108	SNV	G	A	Vorzeitiger Stopp
MLO4 3325..3350	Deletion	26N	--	Vorzeitiger Stopp
MLO4 3368..3372	Deletion	ACTGT	--	Vorzeitiger Stopp

6. Literatur

- Bai Y, Pavan S, Zheng Z, Zappel NF, Reinstädler A, Lotti C, De Giovanni C, Ricciardi L, Lindhout P, Visser R, Theres K, Panstruga R (2008) Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a central American tomato accession is caused by loss of *Mlo* function. *Mol Plant-Microbe Interact* 21:30–39.
- Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk P, Töpsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P (1997) The barley *Mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88:695–705.
- Consonni C, Humphry ME, Hartmann HA, Livaja M, Durner J, Westphal L, Vogel J, Lipka V, Kemmerling B, Schulze-Lefert P, Somerville SC, Panstruga R (2006) Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat Genet* 38:716–720.
- Debener T, Linde M (2009) Exploring complex ornamental genomes: the rose as a model plant. *Crit Rev Plant Sci* 28:267-280.
- Horst RK, Cloyd RA (2007) Compendium of Rose Diseases and Pests. American Phytopath Soc, St Paul, USA.
- Feechan A, Jermakow AM, Torregrosa L, Panstruga R, Dry IB (2008) Identification of grapevine *MLO* gene candidates involved in susceptibility to powdery mildew. *Funct Plant Biol* 35:1255-1266.
- Jorgensen JH(1977) Spectrum of resistance conferred by *ML-O* powdery mildew resistance genes in barley. *Euphytica* 26:55–62.
- Kaufmann H, Qiu X, Wehmeyer J, Debener T (2012) Isolation, molecular characterization, and mapping of four rose *MLO* orthologs. *Front Plant Sci* 3:244.
- Linde M, Debener T (2003) Isolation and identification of eight races of powdery mildew of roses (*Podosphaera pannosa* (Wallr.: Fr.) de Bary and the genetic analysis of the resistance gene *Rpp1*. *Theor Appl Genet* 107:256–262.
- Linde M, Hattendorf A, Kaufmann H, Debener T (2006) Powdery mildew resistance in roses: QTL mapping in different environments using selective genotyping. *Theor Appl Genet* 113:1081–1092.
- Marroni F, Pinosio S, Di Centa E, Jurman I, Boerjan W, Felice N, Cattonaro F, Morgante M (2011) Large-scale detection of rare variants via pooled multiplexed next-generation sequencing: towards next-generation Ecotilling. *Plant J* 67: 736-745.
- Panstruga R (2005) Discovery of novel conserved peptide domains by ortholog comparison within plant multi-protein families. *Plant Mol Biol* 59:485–500.
- Pavan S, Jacobsen E, Visser RG, Bai Y (2010) Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Mol Breeding* 25:1-12.
- Pavan S, Schiavulli A, Appiano M, Marcotrigiano AR, Cillo F, Visser RG, Bai Y, Lotti C, Ricciardi L (2011) Pea powdery mildew *er1* resistance is associated to loss-of-function mutations at a *MLO* homologous locus. *Theor Appl Genet* 123:1425-1431.
- Reinstädler A, Müller J, Czembor JH, Piffanelli P, Panstruga R (2010) Novel induced *mlo* mutant alleles in combination with site-directed mutagenesis reveal functionally important domains in the heptahelical barley *Mlo* protein. *BMC Plant Biol* 10:31.