

Entwicklung eines Resistenztests gegen den Bakterienbrand an Sojabohnen

Daniela Villacrés de Papajewski, Emilie Grisot, Claude-Alain Bétrix, Arnold Schori und Fabio Mascher
Agroscope, Institut für Pflanzenbauwissenschaften IPB, 1260 Nyon, Schweiz

Auskünfte: Fabio Mascher, E-Mail: fabio.mascher@agroscope.admin.ch



Abb. 1 | Test zur Resistenz von Sojabohnen gegen den Bakterienbrand, verursacht durch *Pseudomonas* spp. Die Pflanzen wurden im Stadium des ersten entfalteteten dreiteiligen Blatts (etwa 15 bis 18 Tage nach Aussaat) für die künstlichen Infektionen verwendet.

Einleitung

Die Sojabohne (*Glycine max* [L.] Merr.) wird wegen ihres hohen Eiweissgehalts angebaut, aber auch wegen der Fähigkeit, mit Hilfe von an den Wurzeln lebenden Bakterien der Gattung *Bradyrhizobium* Stickstoff aus der Atmosphäre zu binden. Weil die Sojabohne Stickstoffverbindungen in den Boden einträgt, ist ihre Kultur ein Schlüsselement in der Fruchtfolge (Sindelar *et al.* 2015; Charles und Vullioud 2001). Neben ihrer landwirtschaftlichen Bedeutung wird ihr auch von der Lebensmittelindustrie in Europa ein immer grösseres Interesse entgegengebracht. Die steigende Nachfrage nach nicht gentechnisch veränderter Soja hat einen stetigen Anstieg der kultivierten Flächen zur Folge, was die Entwicklung neuer Sorten erfordert, die leistungsfähiger und immer besser an die europäischen Bedingungen angepasst sind.

Bei ihren Bemühungen, die hohe Produktivität der Kultur aufrecht zu erhalten, muss sich die Züchtung immer stärker auch mit Krankheiten auseinandersetzen,

die durch Pilze und Bakterien verursacht werden (Hymowitz *et al.* 2015). Der Erreger des Bakterienbrands, das blattbesiedelnde Bakterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, tritt in den Kulturen relativ häufig auf. Die Krankheit äussert sich durch eckige Flecken, Nekrosen und Risse auf der Blattspreite. Bei entsprechenden meteorologischen Bedingungen kann es zu einem Welken der Blätter und zu einem Ertragsverlust von bis zu 15 % kommen (Siegel *et al.* 2008). Nach der Infektion der Pflanze kontaminiert der Erreger das Saatgut und verursacht einen Qualitätsverlust des Saatgutes mit einer verminderten Keimfähigkeit (Gaignard und Luisetti 1993). Der Befall hat nur in sehr seltenen Fällen schwere wirtschaftliche Folgen. Der Nachweis des Erregers auf dem Saatgut kann jedoch den Verkauf des Saatgutes und die Verbreitung besonders anfälliger Sorten beeinträchtigen. Da kontaminiertes Saatgut die hauptsächliche Infektionsquelle der Krankheit ist, stellt die Verwendung von nicht kontaminiertem Saatgut ein wichtiges Werkzeug im Kampf gegen die Krankheit dar. Die Prävention der Krankheit beginnt mit der Produktion von nicht-kontaminiertem Saatgut. Die Verwendung von resistenten Sorten schränkt später das Infektionsrisiko ein. Die Resistenz ist somit ein Kriterium für die Sortenwahl. Die Züchtung resistenter Sorten und die Einschätzung der Resistenz der auf dem Markt erhältlichen Sorten sind deshalb für die Sojaproduzenten und für die Saatgutproduzenten von hohem Interesse.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Test zu entwickeln, mit dem die Resistenz von Sojapflanzen gegen *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* geprüft werden kann. Ein solcher Test muss die natürliche Übertragung des Erregers simulieren und Symptome hervorrufen, die dem Krankheitsbild im Feld entsprechen, damit die Resistenz und die Resistenzgene untersucht werden können.

Die Resistenz von Soja gegenüber dieser Bakteriose wird durch Resistenzgene vermittelt (Ashfield *et al.* 1995). Bei diesem Gen-für-Gen-Konzept steht dem Avirulenzgen (*avr*) des Pathogens ein Resistenzgen (*r*) der Pflanze gegenüber. Wenn das Avirulenzgen des

Erregers erkannt wird, setzt die Pflanze eine Reihe von Abwehrmechanismen ein, mit denen sie sich effizient vor dem Erreger schützen kann (Qi *et al.* 2007). Bis heute wurden neun physiologische Rassen des Pathogens beschrieben und es sind ebenso viele Resistenzgene der Sojabohne bekannt (Siegel *et al.* 2008). Mit Hilfe dieser Gene vermag die Pflanze das Eindringen von bakteriellen Erregern zu erkennen (Farhatullah *et al.* 2011). Wenn das entsprechende Resistenzgen bei der betreffenden Pflanze fehlt, erkennt sie den Eindringling nicht und das Bakterium kann die Krankheit auslösen (Vidic *et al.* 2013). Das Vorhandensein oder Fehlen eines Resistenzgens im Genom der untersuchten Sojabohne ist also ein zuverlässiger Indikator für die Resistenz respektive Empfindlichkeit der Pflanze gegenüber dem betroffenen Bakterienstamm.

Material und Methoden

Genotypen der Sojabohne und Kultivierungsmethode

In Tabelle 1 sind 91 Genotypen der Sojabohne zusammengestellt. Das Saatgut aller Sorten wurde in Changins 2013 produziert und bei 4°C und geringer relativer Luftfeuchtigkeit (40 % HR) gelagert, um eine hohe Keimfähigkeit langfristig sicherzustellen. Die Körner wurden in Töpfen mit 9 cm Durchmesser und in einem Substrat aus einer Mischung von 60 % Weisstorf, 25 % Pflanzerde und 15 % Perlit ausgesät und mit *Bradyrhizobium japonicum* (de Sangosse, Pont-du-Casse, Frankreich) bestreut. Die Töpfe befanden sich im Treibhaus bei 18 bis 25 °C und 16 Stunden Tageslicht beziehungsweise 8 Stunden Nacht. Die Pflanzen wurden im Stadium des ersten entfalteten dreiteiligen Blatts (etwa 15 bis 18 Tage nach der Aussaat) für die nachfolgend beschriebenen Experimente verwendet (Abb. 1).

Bakterienstämme

Die Bakterienstämme und ihre Herkunft sind in Tabelle 2 beschrieben.

Es handelt sich dabei um drei Stämme von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, die von Tomaten und anderen Pflanzen isoliert und als Pathogen der Sojabohne beschrieben wurden, und um die vier physiologischen Rassen R0, R1, R4 und R6 von *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. Alle Stämme sind gut beschrieben und ihre Avirulenzgene wurden bestimmt. Die Stämme wurden von der CFBP (Collection Française de Bactéries associées aux Plantes, Angers, Frankreich) und von der Pseudomonas-Sammlung an der Virginia Polytechnic Institute and State University in den USA (<http://genome.ppws.vt.edu>) zur Verfügung gestellt.

Zusammenfassung

Der Bakterienbrand an Sojabohnen ist eine Blattkrankheit, die vom Bakterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *syringae* hervorgerufen wird. Die Krankheit verursacht eckige Flecken auf der Blattspreite, beeinträchtigt den Ertrag aber nur selten. Da Saatgut die wichtigste Ansteckungsquelle ist, kann eine Kontamination zu bedeutenden Qualitätsverlusten führen und die Verbreitung anfälliger Sorten behindern. Das beste Mittel zur Vorbeugung dieser Krankheit ist die Verwendung resistenter Sorten. Das Ziel dieser Studie war es, einen Resistenztest für das Gewächshaus zu entwickeln, mit dem der Resistenzgrad von Sojabohnen-Genotypen gegen den Bakterienbrand geprüft werden kann.

Bei der Prüfung der Resistenz von 91 Sojabohnen-Sorten mit sieben Bakterienstämmen, jeder mit einem spezifischen Avirulenzgen zeigte sich eine grosse Vielfalt an Reaktionen. Sämtliche Genotypen waren gegenüber einem Teil der Stämme resistent. Nur bei vier Genotypen wurde eine Resistenz gegen alle geprüften Bakterienstämme festgestellt. Der Test wird nun dazu dienen, die Vielfalt der Avirulenzgene in den *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* Populationen zu bestimmen, um letztlich jene Resistenzgene festzustellen, die für die Prävention von Infektionen oder die Verhinderung der Übertragung des Pathogens über das Saatgut erforderlich sind.

Vermehrung der Bakterien und Herstellung des Inokulums

Die Bakterien wurden langfristig bei -80°C in einer 1:1-Mischung von King's-B-Flüssigmedium und Glycerin (86 %) gelagert (Mascher *et al.* 2014). Frische Bakterienkulturen wurden routinemässig durch King's-B-Agarplatten gewonnen. Für die Herstellung des Inokulums wurde eine einzige Kolonie in 10 ml King's-B-Flüssigmedium übertragen und während 24h auf einem Rotationsinkubator bei 24 °C inkubiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 50 µl verwendet, um King's-B-Agarplatten anzupflanzen. Die Platten wurden bei 24°C während 24 h inkubiert. Der Bakterienrasen wurde mit sterilem, demineralisiertem Wasser abgespült und die so gewonnene Suspension wurde durch eine sterile Glaswollschicht filtriert und durch zwei Zyklen mit Zentrifugation (bei 3000g) und Resuspension in sterilem demineralisiertem Wasser in

Tab. 1 | Liste der im Versuch getesteten Sojabohnen-Linien

Nr.	Linie	Herkunft	Reifegruppe	Züchter	Nr.	Linie	Herkunft	Reifegruppe	Züchter
Zugelassene Schweizer Sorten					Agroscope-Zuchtlinien				
1	Amandine	Schweiz	000-00	Agroscope / DSP (CH)	46	22164	Schweiz	00	Agroscope
2	Amarok	Schweiz	000-00	Agroscope / DSP (CH)	47	22214	Schweiz	00	Agroscope
3	Aveline	Schweiz	000	Agroscope / DSP (CH)	48	22216	Schweiz	000	Agroscope
4	Castétis	Schweiz	II	Agroscope / DSP (CH) / Rolly (FR)	49	22221	Schweiz	00	Agroscope
5	Coraline	Schweiz	00	Agroscope / DSP (CH)	50	22233	Schweiz	000	Agroscope
6	Falbala	Schweiz	00	Agroscope / DSP (CH)	51	22236	Schweiz	00	Agroscope
7	Galice	Schweiz	000-00	Agroscope / DSP (CH)	52	22245	Schweiz	00-0	Agroscope
8	Gallec	Schweiz	000	Agroscope / DSP (CH)	53	22248	Schweiz	00	Agroscope
9	Obélix	Schweiz	000-00	Agroscope / DSP (CH)	54	22263	Schweiz	00	Agroscope
10	Opaline	Schweiz	00	Agroscope / DSP (CH)	55	22267	Schweiz	00-0	Agroscope / DSP (CH)
11	Paco	Schweiz	II	Agroscope / DSP (CH) / Rolly (FR)	56	22277	Schweiz	00	Agroscope / DSP (CH)
12	Paradis	Schweiz	000	Agroscope / DSP (CH)	57	22278	Schweiz	00	Agroscope
13	Pollux	Schweiz	00	Agroscope / DSP (CH)	58	22284	Schweiz	00	Agroscope
14	Proteix	Schweiz	00	Agroscope / DSP (CH)	59	22285	Schweiz	00	Agroscope
15	Protibus	Schweiz	000	Agroscope / DSP (CH)	60	22286	Schweiz	00	Agroscope
16	Tequila	Schweiz	00	Agroscope / DSP (CH)	61	22288	Schweiz	00	Agroscope
17	Tiguan	Schweiz	000	Agroscope / DSP (CH)	62	22290	Schweiz	00	Agroscope
18	Totem	Schweiz	II	Agroscope / DSP (CH) / Rolly (FR)	63	22292	Schweiz	00	Agroscope
19	Tourmaline	Schweiz	00	Agroscope / DSP (CH)	64	22293	Schweiz	00	Agroscope
20	Toutatis	Schweiz	000	Agroscope / DSP (CH)	65	22294	Schweiz	00	Agroscope
Ausländische Sorten und Linien					66	22297	Schweiz	00	Agroscope
21	Lissabon	Österreich	000-00	Saatbau Linz	67	22300	Schweiz	00	Agroscope
22	London	Österreich	00	Saatbau Linz	68	22305	Schweiz	000-00	Agroscope
23	Merlin	Österreich	000	Saatbau Linz	69	22307	Schweiz	000-00	Agroscope
24	Korus	Kanada	00	Semences Prograin Inc.	70	22308	Schweiz	000-00	Agroscope
25	Naya	Kanada	00	Semences Prograin Inc.	71	22309	Schweiz	000-00	Agroscope
26	Primus	Kanada	00	Semences Prograin Inc./RWA (AT)	72	22311	Schweiz	00	Agroscope
27	Saska	Kanada	00	Semences Prograin Inc.	73	22315	Schweiz	000	Agroscope / DSP (CH)
28	Wallace	Kanada	00	Semences Prograin Inc.	74	22317	Schweiz	00	Agroscope
29	M.a	Kanada	00	Semences Prograin Inc.	75	22320	Schweiz	00	Agroscope
30	J3	China	00-0	Zuchtlinie	76	22321	Schweiz	00	Agroscope / DSP (CH)
31	J5	China	000	Zuchtlinie	77	22324	Schweiz	00	Agroscope
32	Lia 20	China	II	Zuchtlinie	78	22325	Schweiz	000	Agroscope
33	Lia 23	China	II	Zuchtlinie	79	22328	Schweiz	000	Agroscope / DSP (CH)
34	Lia 31	China	II	Zuchtlinie	80	22332	Schweiz	00	Agroscope
35	Tiefeng 19A	China	I	Zuchtlinie	81	22335	Schweiz	00	Agroscope
36	Amphor	Frankreich	00	Euralis	82	22336	Schweiz	00	Agroscope
37	Ecuador	Frankreich	000	Euralis	83	22338	Schweiz	00	Agroscope
38	Mentor	Frankreich	00-0	Euralis	84	22343	Schweiz	00	Agroscope
39	Suedina	Frankreich	000	RAGT 2 N (FR)	85	22346	Schweiz	00	Agroscope
40	Sultana	Frankreich	000	RAGT 2 N (FR)	86	22347	Schweiz	00-0	Agroscope
Referenz-Linien					87	22349	Schweiz	00	Agroscope
41	Norchief	Kanada	00	University of Wisconsin	88	22350	Schweiz	00-0	Agroscope
42	Harosoy 63	Kanada		Semences Prograin Inc	89	22351	Schweiz	00-0	Agroscope
43	Flambeau	Kanada	00	University of Wisconsin	90	22353	Schweiz	00-0	Agroscope
44	Merit	Kanada	000	University of Ontario	91	22358	Schweiz	00-0	Agroscope
45	Acme	Kanada	000	University of Ontario					

Falcon-Röhrchen (Corning Inc., Corning, USA) gereinigt. Schliesslich wurde die Suspension auf eine optische Dichte von 0,2 bei 600 nm verdünnt, was einer Konzentration von $5 \cdot 10^8$ CFU/ml entspricht. Die Konzentration wurde jedes Mal durch dezimal Verdünnungen und der Auszählung der koloniebildenden Einheiten auf KB Agar überprüft.

Inokulation und Prüfung der Infektionsstärke

Um die Reaktion der Sojapflanze zu testen wurde die Blattspreite zuerst mit einer Bleistiftspitze perforiert. Dann wurden mit einer Spritze 0,1ml der Bakteriensuspension durch diese Öffnung in die extrazellulären Räume des Blattparenchyms injiziert.

Die von den Bakterien hervorgerufenen Symptome wurden 48 Stunden nach der Infektion bestimmt und die Entwicklung während dreier Wochen beobachtet. Die Symptome nach 48 Stunden wurden mit Hilfe der in Abbildung 2 dargestellten Skala bewertet.

Pflanzen ohne Symptome, die einen ausgetrockneten Hof um die Injektionsstelle oder eine begrenzte Überempfindlichkeitsreaktion zeigten, wurden als resistent eingestuft. Wenn Chlorosen um die verletzte Stelle vorhanden waren oder wenn sich die Infektion auf andere Blattbereiche ausdehnte, wurden die betroffenen Pflanzen dagegen als anfällig bewertet.

Durchführung der Versuche

Im Versuch wurde die Resistenz von 91 Genotypen der Sojabohne gegenüber sieben Stämmen von *Pseudomonas* spp getestet. Der Versuch wurde mit drei Wiederholungen und jeweils zweimal für jede Kombination von

Sorte und Stamm durchgeführt. Die Bewertung der Symptome erfolgte qualitativ und zwischen den Wiederholungen einheitlich. Die Einteilung der Sorten in anfällig oder resistent wurde aufgrund des Durchschnitts der Ergebnisse vorgenommen. Alle Analysen wurden mit Hilfe von Microsoft Excel (Microsoft Corp. Redmond, USA) durchgeführt.

Resultate

Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen

Die Bakterien können verschiedene Arten von lokalen Symptomen hervorrufen, die auf die Umgebung der Inokulationsstelle beschränkt bleiben (Abb. 2). Für die Beurteilung der Symptome wird diese Vielfalt vereinfacht und auf eine qualitative Bewertung nach der Interaktionsart beschränkt. Im Allgemeinen lassen sich als erste, 48 Stunden nach der Injektion des Erregers auftretende Symptome eine rasche Vernarbung der Verletzungen und nekrotisches Gewebe beobachten, was auf eine Sortenresistenz hindeutet, oder durchscheinende Gewebestellen, die drei bis sechs Tage nach der Inokulation chlorotisch werden, was die Empfindlichkeit der Sorte gegenüber dem geprüften Bakterienstamm anzeigt (Abb. 2). Anschliessend kann sich die Infektion auf das angrenzende Gewebe ausbreiten.

Tab. 2 | Getestete Bakterienstämme der Gattung *Pseudomonas*

Stamm	Pathovar	Herkunft	Wirt	Avirulenz-Gene	Referenz	Herkunft des Stamms
PS DC3000	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. tomato</i>	USA	Tomate	<i>avrD, avrE, avrPto</i>	Greenberg & Vinatzer, 2003	PAMDP.ORG, VirginiaTech, Blacksburg, USA
PSS B728a	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. syringae</i>	Amerika	Bohne	<i>avrB, avrE, avrPto, avrRpm</i>	Greenberg & Vinatzer, 2003	Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP)
PSS 642	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. syringae</i>	Amerika	Nicht identifiziertes Unkraut	<i>avrE</i>	Clarke et al., 2010	PAMDP.ORG, VirginiaTech, Blacksburg, USA
PSG R0	<i>Pseudomonas savastanoi</i> <i>pv.glycinea</i>	USA	Sojabohne	<i>avrB0, avrC, avrE</i>	Kucharek & Stall, 1985	Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP)
PSG R1	<i>Pseudomonas savastanoi</i> <i>pv.glycinea</i>	USA	Sojabohne	<i>avrB1, avrC, avrE</i>	Kucharek & Stall, 1985	Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP)
PSG R4	<i>Pseudomonas savastanoi</i> <i>pv.glycinea</i>	USA	Sojabohne	<i>avrA1, avrB0, avrC, avrE, avrPto, avrRpm, avrRsp 4</i>	Kucharek & Stall, 1985	Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP)
PSG R6	<i>Pseudomonas savastanoi</i> <i>pv.glycinea</i>	USA	Sojabohne	<i>avrA1, avrE</i>	Kucharek & Stall, 1985	Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP)

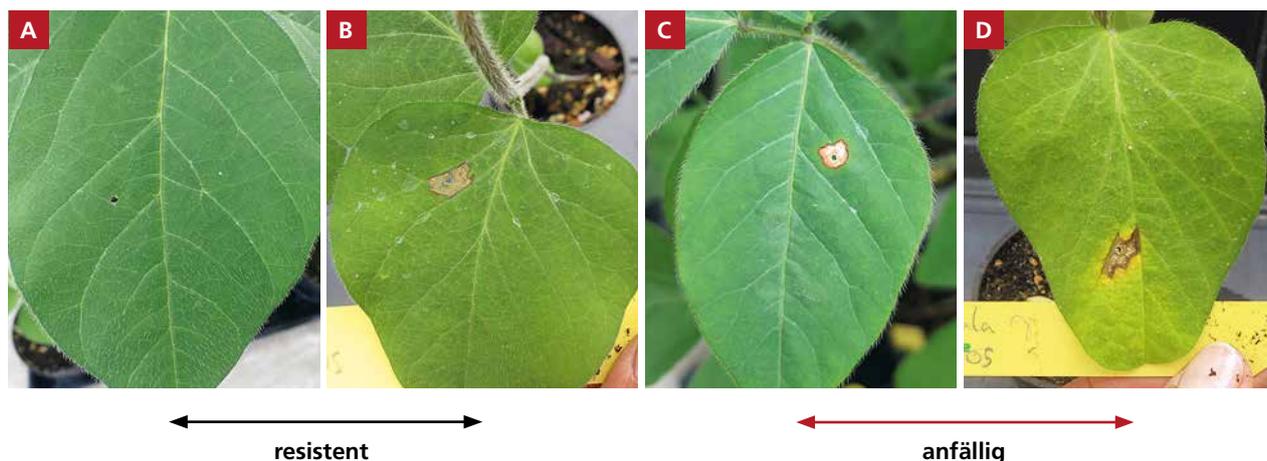


Abb. 2 | Bei der Beschreibung der verschiedenen Sojabohnenlinien verwendete Skala für die Symptome. Die Symptome wurden im Zeitraum von 48 bis 72 Stunden nach der Infektion bewertet: A. Ohne Symptome; B. Austrocknung des infizierten Gewebes; C. Nekrotische Zellen mit beginnender Chlorose; D. Stark ausgeprägte Chlorosen.

Bewertung der Resistenz

Die Ergebnisse der Interaktion zwischen den Sojabohnen-Genotypen und den sieben Bakterienstämmen sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Stämme DC3000, PSS 642, PSS B728a und PSG R4 haben keine Chlorosen hervorgerufen (Abb. 3). Die anderen Stämme, die alle zur Gruppe *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* gehören, lösten bei einigen Sorten Symptome aus. In Abbildung 4 ist der Anteil der Sojabohnen-Genotypen angegeben, die empfindlich auf die Erreger-Stämme reagierte. Abbildung 3 zeigt die Komplexität der beteiligten Resistenzgene. Alle Genotypen sind gegen mindestens vier Bakterienstämme resistent und 93 % gegen fünf Stämme. Nur 4 % der Genotypen sind gegen alle hier getestete Stämme resistent.

Identifikation der Resistenzgene

Umgekehrt lassen sich mit Hilfe dieses Tests Resistenzgene in den getesteten Sorten postulieren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass alle Sorten über das Resistenzgen gegen den Stamm *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* Rasse 4 verfügen (Abb. 4.). Das Avirulenzgen *avrE* ist somit in allen untersuchten Stämmen vorhanden. Die drei virulenten Stämme unterscheiden sich durch die Avirulenzgene *avrB0*, *avrB1* beziehungsweise *avrC*. Eine bestimmte Zahl von Linien vermag diese Avirulenzgene zu erkennen und man kann postulieren, dass diese Linien über die entsprechenden Resistenzgene verfügen. Die Rasse 6 weist als einziger Stamm das Avirulenzgen *avrA1* auf. Das entsprechende Resistenzgen ist nur in sechs Genotypen vorhanden. Vier dieser sechs Genotypen enthalten auch alle anderen hier untersuchten Resistenzgene und sind für die Pflanzenzüchtung deshalb von besonderem Interesse.

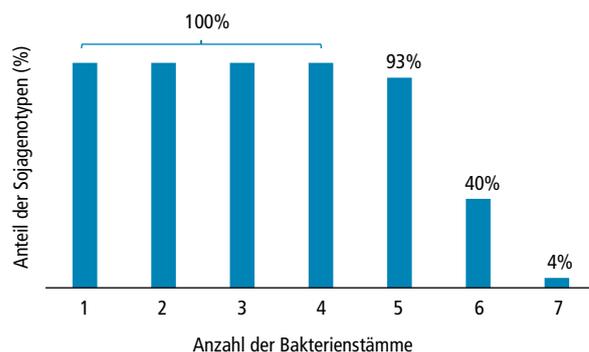


Abb. 3 | Prozentualer Anteil der gegen die Bakterienstämme resistenten Sojabohnen-Genotypen. Alle Genotypen sind gegen mindestens 4 Stämme des Erregers resistent. 93 % der Sojabohnenlinien zeigen Resistenzen gegen 5 Stämme. Nur gerade 4 % der Linien sind gegen alle sieben Bakterienstämme resistent.

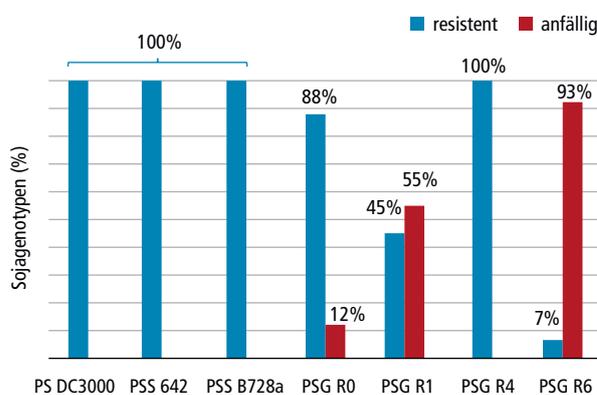


Abb. 4 | Darstellung der Sortenresistenz von Sojabohnen. Prozentualer Anteil der resistenten oder anfälligen Sorten pro Bakterienstamm.

Tab. 3 | Beobachtete Reaktionen nach der Inokulation verschiedener Bakterienstämme von *Pseudomonas* spp. bei 91 Sojabohnen-Phänotypen. R (resistent): inkompatible Reaktion mit nekrotischen Zellen ohne Entwicklung von Symptomen und S (suszeptibel): kompatible Reaktion mit durchscheinendem Gewebe und Chlorosen.

Nr.	Name	PS DC3000	PSS 642	PSS B728a	PSG R0	PSG R1	PSG R4	PSG R6	Nr.	Name	PS DC3001	PSS 643	PSS B728a	PSG R0	PSG R1	PSG R4	PSG R6
Zugelassene Schweizer Sorten									Agroscope-Zuchtlinien								
1	Amandine	R	R	R	R	R	R	S	46	22164	R	R	R	R	S	R	S
2	Amarok	R	R	R	R	R	R	S	47	22214	R	R	R	R	S	R	S
3	Aveline	R	R	R	R	S	R	S	48	22216	R	R	R	R	S	R	S
4	Castétis	R	R	R	R	S	R	S	49	22221	R	R	R	R	R	R	S
5	Coraline	R	R	R	R	S	R	S	50	22233	R	R	R	R	R	R	S
6	Falbala	R	R	R	R	R	R	S	51	22236	R	R	R	R	R	R	S
7	Galice	R	R	R	R	R	R	S	52	22245	R	R	R	R	R	R	S
8	Gallec	R	R	R	R	S	R	S	53	22248	R	R	R	S	S	R	S
9	Obélix	R	R	R	R	R	R	S	54	22263	R	R	R	R	S	R	S
10	Opaline	R	R	R	R	S	R	S	55	22267	R	R	R	R	S	R	S
11	Paco	R	R	R	R	S	R	S	56	22277	R	R	R	R	S	R	S
12	Paradis	R	R	R	R	R	R	S	57	22278	R	R	R	S	R	R	S
13	Pollux	R	R	R	R	S	R	S	58	22284	R	R	R	R	R	R	S
14	Proteix	R	R	R	R	S	R	S	59	22285	R	R	R	R	S	R	S
15	Protibus	R	R	R	R	R	R	S	60	22286	R	R	R	R	R	R	S
16	Tequila	R	R	R	R	R	R	S	61	22288	R	R	R	S	R	R	S
17	Tiguan	R	R	R	R	R	R	S	62	22290	R	R	R	R	S	R	S
18	Totem	R	R	R	R	S	R	S	63	22292	R	R	R	R	R	R	S
19	Tourmaline	R	R	R	R	S	R	S	64	22293	R	R	R	S	R	R	S
20	Toutatis	R	R	R	R	R	R	S	65	22294	R	R	R	S	S	R	S
Ausländische Sorten und Linien									66	22297	R	R	R	R	S	R	S
21	Lissabon	R	R	R	S	S	R	S	67	22300	R	R	R	R	S	R	S
22	London	R	R	R	R	R	R	S	68	22305	R	R	R	R	S	R	S
23	Merlin	R	R	R	R	S	R	S	69	22307	R	R	R	R	S	R	S
24	Korus	R	R	R	R	S	R	S	70	22308	R	R	R	R	S	R	S
25	Naya	R	R	R	R	S	R	S	71	22309	R	R	R	S	S	R	S
26	Primus	R	R	R	R	S	R	S	72	22311	R	R	R	R	R	R	S
27	Saska	R	R	R	R	R	R	S	73	22315	R	R	R	R	S	R	S
28	Wallace	R	R	R	S	S	R	S	74	22317	R	R	R	R	R	R	S
29	M.a	R	R	R	R	S	R	S	75	22320	R	R	R	R	S	R	S
30	J3	R	R	R	R	S	R	S	76	22321	R	R	R	R	R	R	S
31	J5	R	R	R	R	S	R	R	77	22324	R	R	R	R	S	R	S
32	Lia 20	R	R	R	S	S	R	S	78	22325	R	R	R	R	R	R	S
33	Lia 31	R	R	R	R	S	R	S	79	22328	R	R	R	R	R	R	S
34	Lia 23	R	R	R	R	S	R	R	80	22332	R	R	R	R	S	R	S
35	Tiefeng 19A	R	R	R	R	R	R	R	81	22335	R	R	R	R	R	R	S
36	Amphor	R	R	R	S	R	R	S	82	22336	R	R	R	R	R	R	S
37	Ecuador	R	R	R	S	R	R	S	83	22338	R	R	R	R	R	R	S
38	Mentor	R	R	R	R	S	R	S	84	22343	R	R	R	R	S	R	S
39	Suedine	R	R	R	R	S	R	S	85	22346	R	R	R	R	R	R	S
40	Sultana	R	R	R	R	S	R	S	86	22347	R	R	R	R	R	R	S
Referenz-Linien									87	22349	R	R	R	R	S	R	S
41	Norchief	R	R	R	R	R	R	R	88	22350	R	R	R	R	S	R	S
42	Harosoy 63	R	R	R	R	S	R	S	89	22351	R	R	R	R	R	R	S
43	Flambeau	R	R	R	R	R	R	R	90	22353	R	R	R	R	R	R	S
44	Merit	R	R	R	R	R	R	R	91	22358	R	R	R	R	S	R	S
45	Acme	R	R	R	R	R	R	S									

Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, einen Test für das Gewächshaus zu entwickeln, mit dem die Resistenz von Sojabohnen gegen den durch *Pseudomonas savastanoi* pv *glycinea* verursachten Bakterienbrand ermittelt werden kann. Mit dem verwendeten Versuchsansatz kann die Resistenz der Sorten beschrieben werden. Da die eingesetzten Bakterienstämme spezifische Avirulenzgene enthalten, konnte auch auf das Vorhandensein der entsprechenden Resistenzgene geschlossen werden.

Die Virulenz der Stämme von *Pseudomonas* spp., die nicht von der Sojabohne isoliert, aber als pathogene Erreger beschrieben worden waren (Gaignard & Luisetti 1993), konnte nicht bestätigt werden. Das Avirulenzgen *avrD* des Stammes *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* DC3000 ist als Entsprechung für das Resistenzgen *rpg4* der Sojabohne bekannt (Slaymaker & Keen, 2004). Dieses Resistenzgen ist in dieser Art sehr weit verbreitet (Farhatullah et al., 2011). Es überrascht deshalb nicht, dass die Resistenz *Rpg4* in allen untersuchten Genotypen vorhanden ist. Diese Feststellung gilt auch für den aus Sojabohnen isolierten Stamm *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* Rasse R4. Dieser Stamm war jedoch als sehr virulent gegenüber einem breiten Spektrum von Sojabohnen-Genotypen beschrieben worden, darunter auch die in unserem Versuch geprüften Sorten Acme, Flambeau und Norchief (Staskawicz et al. 1984). In unserem Versuch hat der Stamm 24h und 48h nach der Infektion nur Nekrosen hervorgerufen, die wir als Überempfindlichkeitsreaktion und damit als Resistenz interpretierten (Keen & Buzzell, 1991). Unter der Voraussetzung, (a) dass wir denselben Stamm wie die Autoren der Referenzpublikation (Staskawicz et al. 1984) verwendeten und (b) dass die Infektionsbedingungen für *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* günstig waren, lässt sich annehmen, dass der Stamm PSG R4 seine Virulenz verloren hat. Auch Vidic et al. (2013) haben die Hypothese aufgestellt, dass der Stamm mutiert ist. Der Stamm PSG R6 ist gegenüber 96 % der getesteten Linien virulent. Er unterscheidet sich dadurch, dass er das Avirulenzgen *avrA1* besitzt (Vidic et al. 2013), das von den Sojabohnen-Genotypen mit dem Resistenzgen *rpg2* erkannt wird. Zu diesen Genotypen gehören insbesondere die chinesischen Landsorten Tiefeng 19A, J5, Lia 23 sowie die Sorten Merit, Fambeau und Norchief.

Der hier vorgestellte Resistenztest ermöglicht eine Gesamteinschätzung und detaillierte Aussagen zur Resistenz. Er ist ein wertvolles Werkzeug für die Sortenbeschreibung und die Züchtung resistenter Sorten. Die Möglichkeit, spezifische Resistenzgene zu nutzen, sollte eine gezieltere Verbesserung der Sorten ermöglichen.

Der Einsatz spezifischer molekularer Marker für Resistenzgene ist ein sehr wirksames Werkzeug, mit dem die Identifikation resistenter Linien bei der Züchtung beschleunigt wird. Bisher stehen jedoch erst für das Resistenzgen *rpg1-b* (das mit *avrB1* interagiert) molekulare Marker zur Verfügung (Ashfield et al. 2003).

Im Sinne einer Vervollständigung dieser Arbeit wäre es wünschenswert, die Diversität der Avirulenzgene in den Populationen des Erregers in der Schweiz und in Europa besser zu kennen. Mit einer solchen Studie könnten die Resistenzgene bestimmt werden, die für eine Aufrechterhaltung eines akzeptablen Resistenzniveaus erforderlich sind.

Schlussfolgerungen

- Es wurde ein Test zur Prüfung der Resistenz von Sojabohnen gegen den Bakterienbrand entwickelt und validiert.
- Die künstliche Infektion erfolgte durch Verletzungen der Blätter junger Pflanzen und die Symptome wurden nach drei bis fünf Tagen bonitiert.
- Im Allgemeinen zeigten die in diesem Versuch geprüften Sorten und Linien Resistenzen gegenüber einem Teil der Bakterienstämme. Nur vier Genotypen sind gegen sämtliche Bakterienstämme vollständig resistent.
- Dieser Test wird es ermöglichen, die Vielfalt der gegenwärtig auftretenden Bakterienstämme zu untersuchen, um festzulegen, welche Resistenzgene erforderlich sind. Die Zunahme der Soja-Anbaufläche in Europa macht die Entwicklung neuer Werkzeuge erforderlich, welche die Bemühungen zur Züchtung von krankheitsresistenten Sorten unterstützen. ■

Riassunto

Resistenza contro la maculatura batterica della soia

La maculatura batterica della soia è una malattia fogliare provocata da *Pseudomonas savastanoi pv. glycinea*. La malattia si manifesta con delle macchie angolari sul lembo fogliare ma causa solo raramente delle perdite di resa. Tuttavia, essendo i semi la principale fonte d'inoculo, la presenza di sementi contaminate può nuocere alla diffusione di varietà. Ciò rende l'uso di varietà resistenti il modo migliore per prevenire la malattia. Lo scopo del presente studio è di sviluppare un test di resistenza in serra che permetta di valutare la resistenza di genotipi di soia contro la maculatura batterica. I risultati, ottenuti con 7 ceppi recanti geni d'avirulenza specifica su 91 genotipi di soia, mostrano un largo spettro d'interazioni. Tutti i genotipi di soia sono resistenti contro una parte dei ceppi, ma solo 4 varietà, impiegate come referenza, mostrano una resistenza completa contro tutti i ceppi batterici. Questo test in serra servirà ora a esaminare la diversità dei geni d'avirulenza presenti nelle popolazioni di *Pseudomonas savastanoi pv. glycinea*, ciò che permetterà di determinare i geni di resistenza utili per prevenire efficacemente la maculatura batterica e la trasmissione del patogeno tramite le sementi.

Literatur

- Ashfield T., Keen N., Buzzell R. I. & Innes R. W., 1995. Soybean resistance genes specific for different *Pseudomonas syringae* avirulence genes are allelic or closely linked, at the Rpg1 locus. *Genetics* **141** (4), 1597–1604.
- Ashfield T., Bocian A., Held D., Henk A.D., Fredrick Marek L., Danesh D., Peñuela S., Meksem K., Lightfoot D. A., Young N. D., Shoemaker R. C. & Innes R. W., 2003. Genetic and physical localization of the Soybean Rpg1-b disease resistance gene reveals a complex locus containing several tightly linked families of NBS-LRR genes. *Molecular Plant Microbe Interactions* **16** (9), 817–826.
- Charles R. & Vulllioud P., 2001. Pois protéagineux et azote dans la rotation. *Revue suisse d'Agriculture* **33** (6), 265–270
- Clarke C. R., Cai R., Studholme D. J., Guttman D. S. & Vinatzer B. A., 2010. *Pseudomonas syringae* strains naturally lacking the classical *P. syringae* hrp/hrc locus are common leaf colonizers equipped with an atypical type III secretion system. *Molecular Plant Microbe Interactions* **23**, 198–210.
- Farhatullah, Stayton M. M., Groose R. W. & Khan M. J., 2011. Genetic analysis of race-specificity of *Pseudomonas syringae pv. glycinea*. *Pakistan Journal of Botany* **43** (1), 7–13.
- Gaignard J. I. & Luisetti J., 1993. *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaço-gène et pathogène. *Agronomie* **13** (5), 333–370.
- Greenberg J. T. & Vinatzer B. A., 2003. Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Current Opinion in Microbiology* **6** (1), 20–8.
- Hymowitz T., Nelson R. L., Sinclair J. B. & Hartman G. L., 2015. History and Growth of the Soybean Plant. In: Compendium of Soybean Diseases and Pests, Fifth edition. (Ed. G. L. Hartman, J. C. Rupe, E. J. Sikora, L. L. Domier, J. A. Davis & K. L. Steffey). American Phytopathological Society, St. Paul, USA. 1–4.

Summary

Creating a test to measure resistance to soybean

Bacterial blight is a foliar disease caused by *Pseudomonas savastanoi pv. glycinea*. The disease is characterised by angular leaf spots yet with only little impact on the yield. The seeds constitute the primary source of inoculum, and contaminated seeds may affect the diffusion of new varieties. The best approach to preventing the disease is to use resistant varieties. The aim of this study was to develop a resistance test for the greenhouse to determine the resistance of soybean lines to bacterial blight. The test included seven bacterial strains with distinct and specific avirulence genes tested on 91 soybean genotypes. The results exhibit a wide spectrum of interactions. Whilst all genotypes were resistant to part of the bacteria, only four varieties were resistant to all bacterial strains. This test will be used to screen the diversity of avirulence genes present in the populations of *Pseudomonas savastanoi pv. glycinea* in order to determine which resistance genes are most useful for preventing bacterial blight and the transmission of the seed-borne pathogen.

Key words: *Pseudomonas savastanoi pv. glycinea*, gene postulation, bacterial blight, artificial infection.

- Keen N. T. & Buzzell R. I., 1991. New resistance genes in soybean against *Pseudomonas syringae pv. glycinea*: evidence that one of them interacts with a bacterial elicitor. *Theoretical and Applied Genetics* **81**, 133–138.
- Kucharek T. & Stall R. E., 1985. A bacterial leaf spot disease of soybean caused by a new race of *Pseudomonas syringae pv. glycinea*. *Proceedings- Soil and Crop Science Society of Florida* **44**, 174–177.
- Mascher F., Hase C., Bouffaud M.-L., Défago G. & Moënn-Loccoz, Y., 2014. Cell culturability of *Pseudomonas protegens* CHA0 depends on soil pH. *FEMS Microbiology Ecology* **87**, 441–450.
- Qi M., Wang D., Bradley C. A. & Zhao Y., 2011. Genome sequence analyses of *Pseudomonas savastanoi pv. glycinea* and subtractive hybridization based comparative genomics with nine *Pseudomonads*. *PLoS One* **6** (1), e16451.
- Siegel S. P., Zhao Y. F. & Bradley C. A., 2008. Race characterization of *Pseudomonas savastanoi pv. glycinea* in Illinois. *Phytopathology* **98**, S146.
- Sindelar A. J., Schmer M. R., Jin V. L., Wienhold B. J. & Varvel G. E., 2015. Long-term corn and soybean response to crop rotation and tillage. *Agronomy Journal* **107** (6), 2241–2252.
- Slaymaker D. & Keen N., 2004. Syringolide elicitor-induced oxidative burst and protein phosphorylation in soybean cells, and tentative identification of two affected phosphoproteins. *Plant Science* **166**, 387–396.
- Staskawicz B., Dahlbeck D. & Keen N., 1984. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae pv. glycinea* determines race-specific incompatibility on Glycine max (L.) Merr. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **81**, 6024–6028.
- Vidic M., Dordevic V., Petrovic & Miladinovic J., 2013. Review of Soybean Resistance to Pathogens. *Ratarstvo i Povrtarstvo* **50** (2), 52–61.