



Melampsora-Resistenztests in Pappeln

Eine Infektion mit Pappelrost (*Melampsora spec*) führt zu vorzeitigem Blattverlust, einem verspäteten Austrieb und daher zu Biomasseverlust in der nächsten Wachstumsperiode. Für eine schnelle und einfach handhabbare Bestimmung der Anfälligkeit oder der Resistenz der Pappel gegenüber Pappelrost wurde ein In-vitro-Infektionstest etabliert. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Gattung *Populus* in fünf Sektionen unterteilt ist und dass die Arten in den Sektionen unterschiedlich anfällig gegenüber verschiedenen Pappelrost-Stämmen sind.

TEXT: KHIRA DEECKE, MATTHIAS FLADUNG

In Mitteleuropa hat der immer rasanter ablaufende Klimawandel zur Folge, dass nicht nur die Jahresmitteltemperaturen steigen, sondern es lokal auch zu immer trockeneren und heißeren Sommern kommt. Das macht den heimischen Baumarten aus zweierlei Gründen schwer zu schaffen. Zum einen führen Wassermangel und lang anhaltende Trockenheit bei vielen Bäumen zu einer Schwächung der individuellen physischen Konstitution („Fitness“). Zum anderen werden auf diese Weise physisch geschwächte Bäume anschließend von bereits existierenden, aber auch von neuen, wärmeliebenden Schädlingen und Krankheitserregern – phytopathogenen Pilzen und Insekten, die bisher nicht in Deutschland vorkommen – bedroht.

Da sich jedoch der Klimawandel innerhalb weniger Jahrzehnte vollziehen



Abb. 1: Mit Pappelrost infizierte Pappelblätter in verschiedenen Stadien des Befalls

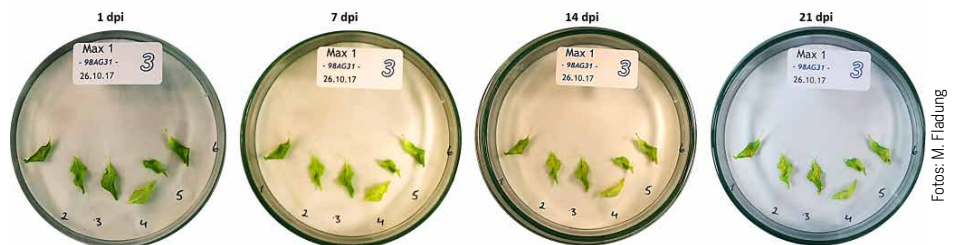


Abb. 2: Fotografische Darstellung der Infektionsversuche an den Boniturtagen. Die Aufnahmen erfolgten zu vier Zeitpunkten nach der Inokulation. Tag 1 nach Infektion (1 dpi = day post inoculation), Tag 7 nach Infektion (7 dpi), Tag 14 nach Infektion (14 dpi) und Tag 21 nach Infektion (21 dpi). Dargestellt ist der Klon Max1, der der Sektion Aigeiros/Tacamahaca angehört; der verwendete *Melampsora*-Stamm ist *M. larici-populina* (98AG31).

Foto: M. Fladung

Fotos: M. Fladung

Schneller ÜBERBLICK

- » **Pappelrost (*Melampsora spec*)** stellt eine erhebliche Bedrohung für Pappeln dar
- » **Ein in-vitro-Infektionstest** mit *M. larici-populina* und *M. larici-tremulae* wurde etabliert
- » **Das Befallsspektrum zeigt** sowohl sektionsspezifische als auch klonspezifische Unterschiede

wird, ist eine züchterische Anpassung von Forstgehölzen an die veränderten Klimabedingungen aufgrund der langen Generationszyklen von Bäumen mittels klassischer Resistenzzüchtung unter Umständen zu langsam. Daher müssen auch andere Strategien entwickelt und alternative Maßnahmen ergriffen werden, um die einheimischen Waldbaumarten zu schützen.

Für Pappeln stellt der Pappelrost (*Melampsora spec.*) eine der schlimmsten Bedrohungen dar [1]. Zur Gattung *Melampsora* werden heute über 50 verschiedene Arten gezählt, die über-

wiegend verholzende Pflanzen befallen. Für Pappeln sehr bedeutsam sind u. a. zwei miteinander nahe verwandte Rostpilzarten, *M. larici-populina* und *M. larici-tremulae*. Im Jahr 2011 wurde die gesamte Sequenz des Genoms des *M. larici-populina*-Stamms 98AG31 publiziert [2] (<https://genome.jgi.doe.gov/Mellp1/Mellp1.home.html>). *M. larici-populina* löst Rostinfektionen zwar bei fast allen bekannten Pappelklonen aus – unabhängig von der Sektionszugehörigkeit –, allerdings bevorzugt dieser Pilz Pappelklone, die den Sektionen Aigeiros und Tacamahaca angehören.

Pappelklone der Sektion *Populus* werden hauptsächlich von *M. larici-tremulae* befallen. Die intensiven *Melampsora*-Infektionen gehen zumeist mit einer Anfälligkeit gegenüber anderen Pathogenen einher, was in der Konsequenz das Wachstum der Pappeln deutlich reduziert.

Um erste Hinweise auf das Toleranzspektrum von Pappelsorten gegenüber *Melampsora spec.* zu erhalten, wurde in Anlehnung an [3] ein In-vitro-Infektionstest mit Blättern etabliert. Hierzu wurden Blattunterseiten in einer semi-feuchten Kammer mit einer Sporensuspension für 21 Tage inkubiert und wöchentlich bonitiert. Die Auswertung erfolgte durch iterative Abschätzung der befallenen Blattfläche in Prozent. Wir haben mit dieser Methode 20 verschiedene in vitro-kultivierte Pappelklone (Tab. 1, nach [4]) aus drei verschiedenen Sektionen [5] auf ihre Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber *M. larici-populina* und *M. larici-tremulae* untersucht.

Gewinnung und Kultivierung der beiden Rostpilzarten

Der sequenzierte *M. larici-populina*-98AG31-Stamm wurde von Dr. Pascal Frey (INRAE, Universität Lorraine, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Sporen des *M. larici-tremulae*-Stamms wurden im Oktober 2016 von Blattunterseiten von *P. × canescens*-Individuen (P1), die seit 2013 im Arboretum des Thünen-Instituts für Forstgenetik (Großhansdorf, Deutschland) kultiviert werden, entnommen. Die Identität des *M. larici-tremulae*-Stamms wurde nach Sequenzierung der Internal Transcribed Spacer-Region (ITS) und des NADH dehydrogenase subunit 6-Gens (NAD6) bestätigt.

Die Kultivierung der beiden Rostpilzarten erfolgte nach [6] auf Blattmaterial von anfälligen Pappelklonen in einer semi-feuchten Kammer. Hierfür wurden zunächst zwei Filterpapiere (Rundfilter MN640, 90 mm × 0,2 mm) in einer sterilisierten Glaspetrischale (Durchmesser 10 cm) mit 1.800 µl sterilem Leitungswasser befeuchtet. Anschließend wurden Blätter von anfälligen Pappelklonen mit der Blattunterseite nach oben auf das befeuchtete Filterpapier platziert. Die Sporensuspension, bestehend aus *Melampsora*-Sporen in Agar-Wasser (0,1 g/l steriles Leitungswas-

„Für Pappeln stellt Pappelrost eine der schlimmsten Bedrohungen dar.“

MATTHIAS FLADUNG

ser), wurde in mehreren 1-µl-Tropfen pro Blatt mittels einer Pipette unter semi-sterilen Bedingungen aufgetragen. Die Sporensuspension wurde anschließend mit einem Apothekerspatel auf der Blattunterseite verstrichen. Die so vorbereiteten Glaspetrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und in einem RUMED-Wachstumsschrank (Rubarth Apparate GmbH, Laatzen, Deutschland) für 14 Tage bei 19 °C und einer dauerhaften Beleuchtung von etwa 11 µE/

m²/s¹) inkubiert. Trockene Sporen wurden über steriler Aluminiumfolie abgeklopft [6], in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

Vorbereitung der Sporensuspension und des Blattmaterials

Am Vortag eines Infektionsversuchs wurden die bei -20 °C gelagerten Sporen aufgetaut und in 100 µl Agar-Wasser (0,1 g/l steriles Leitungswasser = 0,01 %) resuspendiert. Um ein Anhaften der Sporen im Eppendorf-Reaktionsgefäß und den verwendeten Pipettenspitzen zu minimieren, wurde 1 µl von einer Tween20-Verdünnung (10 µl Tween20; 1.500 µl 0,01 % Agar-Wasser) auf 100 µl Agar-Wasser gegeben. Die Sporendichte wurde mit dem Fuchs-Rosenthal-Hämozytometer

Analyse der Anfälligkeit gegenüber *Melampsora spec*

Tab. 1: Verwendete Pappelklone zur Analyse der Anfälligkeit gegenüber *Melampsora spec.* Angegeben sind die Namen der Pappelklone, die Art/der Hybrid und die zugehörige Sektion (nach [5]). Die Informationen bezüglich der Art/des Hybrids wurden aus [4] und [7] entnommen.

Name	Art/Hybrid	Sektion	Land der Züchtung/Selektion
4x Göttingen	<i>P. tremula × P. alba</i> (<i>P. × canescens</i>) tetraploid	Populus	Deutschland
Androscoggin	<i>P. maximowiczii × P. trichocarpa</i>	Tacamahaca	USA
Astria	<i>P. tremula × P. tremuloides</i> triploid	Populus	Deutschland
Aue2	<i>P. deltoides × P. nigra</i>	Aigeiros	Deutschland
Brauna11	<i>P. tremula</i> 1	Populus	Deutschland
D25	<i>P. deltoides</i>	Aigeiros	Argentinien
DN1	<i>P. deltoides × P. nigra</i>	Aigeiros	Argentinien
DN5	<i>P. deltoides × P. nigra</i>	Aigeiros	Argentinien
Esch5	<i>P. tremula × tremuloides</i>	Populus	Deutschland
INRA 717-1B4 „(P1)“	<i>P. tremula × P. alba</i> (<i>P. × canescens</i>)	Populus	Frankreich
Max1	<i>P. nigra × P. maximowiczii</i>	Aigeiros/Tacamahaca	Japan
Muhle Larsen	<i>P. trichocarpa</i>	Tacamahaca	Belgien
Nisqually	<i>P. trichocarpa</i>	Tacamahaca	USA
P7	<i>P. nigra</i>	Aigeiros	Deutschland
Rochester	<i>P. maximowiczii × P. nigra</i> var. <i>Plantierensis</i>	Tacamahaca/Aigeiros	USA
T89	<i>P. tremula × P. tremuloides</i>	Populus	Tschechien
Villafranca	<i>P. alba</i>	Populus	Italien
W52	<i>P. tremula</i>	Populus	Deutschland
Weser4	<i>P. trichocarpa</i>	Tacamahaca	Deutschland
Weser6	<i>P. trichocarpa</i>	Tacamahaca	Deutschland



Sporenlager *Melampsora larici-populina*

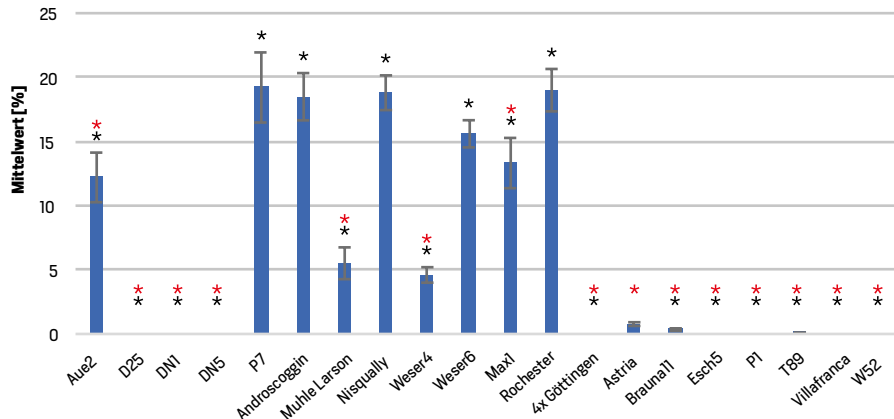


Abb. 3: Mittelwert und Standardfehler (S. E.) der prozentualen, durch Sporenlager eingenommenen Fläche ausgewählter Pappelklone am Boniturtag 21 nach Inokulation mit *M. larici-populina*.

[*]: 95 % signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Klon Nisqually;

[*]: 95 % signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Klon Astria

auf 100 Zellen/µl eingestellt. Anschließend wurde die Sporensuspension über Nacht bei 4 °C gelagert.

Die zu testenden Pappelklone wurden sechs Wochen vor Beginn des Infektionsversuchs als Kopfstecklinge in Magentadosen (Magenta GA-7 Vessel, Sigma-Aldrich, München) mit WPM-Medium (Duchefa Farma B. V., Haarlem, Niederlande) überführt. Um möglichst viele und große Blätter zu generieren, wurden pro Magentadose lediglich zwei Pflanzen angezogen. Am Tag vor dem Infektionsversuch wurden alle Blätter einer Pflanze mit der Blattunterseite nach oben in die Glaspetrischalen mit befeuchtetem Filterpapier überführt, mit Parafilm verschlossen und bis zur Durchführung des Infektionsversuches im Wachstumsschrank unter den bereits oben genannten Bedingungen gehalten.

Durchführung der Infektionsversuche

Am Inokulationstag wurden die Blattunterseiten der Blätter mit Agar-Wasser (0,01 % Agar), mit und ohne Sporen (Kontrollen), inokuliert. Hierfür wurden Blätter bis zu einer Größe von 1 cm² mit 1 µl Agar-Wasser inokuliert. Blätter mit einer Größe von 1,1 bis 1,9 cm² wurden mit 1,5 µl und Blätter größer als 2 cm² wurden mit 2 µl Agar-Wasser bestrichen. Das Agar-Wasser wurde mittig auf die Blattunterseite gegeben und mit einem Apothekerspatel verteilt. Nachdem alle Blätter der zu untersuchenden Klone beimpft waren, wurden sie für 21 Tage im Wachstumsschrank unter den

genannten Bedingungen inkubiert. Am 7., 14. und am 21. Tag nach Inokulation wurden die Blätter auf sichtbare Infektionsmerkmale bonitiert sowie fotografisch dokumentiert (Abb. 2). Zur Bestimmung der befallenen Fläche wurde diese in Prozent zur Gesamtfläche eines jeden Blattes iterativ abgeschätzt.

Infektionstests mit *M. larici-populina*

Bei den Resistenztests mit *M. larici-populina* (98AG31) zeigte es sich, dass Sporenlager auf Blättern aller Klone der Sektion Tacamahaca sowie deren intersektionellen Hybriden nachgewiesen werden konnten (Abb. 3 und 4). Interessanterweise zeigten Aigeiros-Klone ein unterschiedliches Verhalten: Während P7 (*P. nigra*) und Aue2 (*P. deltoides* × *P. nigra*) Infektionsmerkmale aufwiesen, konnten bei D25 (*P. deltoides*) sowie bei DN1 und DN5 (*P. nigra* × *P. deltoides*) keine Infektionsmerkmale nachgewiesen werden. Drei Klone der Sektion Populus mit geringen, dennoch aber nachweisbaren Infektionsmerkmalen waren Brauna11 (*P. tremula*) sowie Astria und T89 (*P. tremula* × *P. tremuloides*). Keine Sporenlager wurden auf den Klonen W52 (*P. tremula*), Villafranca (*P. alba*), Esch5 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) sowie P1 und 4x Göttingen (*P. tremula* × *P. alba*) gefunden.

Neben den Sporenlagern wurden bei der Bonitur nach 21 Tagen auf 13 von 20 Klonen auf den Blättern schwarz verfärbte Bereiche festgestellt (Abb. 4), die als Folge einer nekrotischen Reak-



Abb. 4: Visuelle Erscheinung von Blättern verschiedener Pappelklone am Boniturtag 21 nach Inokulation mit *M. larici-populina*. A: Nisqually; B: Rochester; C: Astria; D: Brauna11. Die Nummern auf Abbildung A und C dienten lediglich der Orientierung bei der Bonitur.

tion auf das Sporeninokulat gedeutet wurde, da beim Kontrollinokulat (ohne Sporen) keine Schwarzfärbung beobachtet werden konnte. Interessanterweise traten die nekrotischen Bereiche sektionenübergreifend auf (Abb. 5). Allerdings wurden die nekrotischen Bereiche nicht auf allen ausgebrachten Blättern eines Klons gefunden.

Infektionstests mit *M. larici-tremulae*

Die Infektionstests mit *M. larici-tremulae* zeigten, dass Sporenlager auf Blättern aller Klone der Sektion Populus nachgewiesen werden konnten (Abb. 6). Die Aigeiros-Klone zeigten ein unterschiedliches Verhalten: P7 (*P. nigra*) zeigte mittlere und DN5 (*P. nigra* × *P. deltoides*) sehr geringe, die anderen Klone (DN1, D25, Aue2) überhaupt keine Infektionsmerkmale. Auch bei den Klonen der Sektion Tacamahaca und ihrer intersektionellen Hybride konnten keine Sporenlager nachgewiesen werden.

Nach Inokulation mit *M. larici-tremulae*-Sporen konnte nach 21 Tagen auf den Blättern von den 20 Klonen eine nekrotische Reaktion nur bei den Klonen Villafranca, Nisqually und DN1 beobachtet werden, alle anderen Klone zeigten keine Reaktion. Wieder wurden die nekrotischen Bereiche nicht auf allen ausgebrachten Blättern der drei Klone gefunden.

Schlussfolgerungen

Die Infektionsversuche verschiedener Pappelklone unterschiedlicher Sektionen mit Sporen von zwei verschiedenen Pappelroststämmen (*M. larici-populina*

Grafik: M. Fladung

Fotos: M. Fladung

und *M. larici-tremulae*) zur Analyse des Befallsspektrums zeigten sowohl sektionsspezifische als auch klonenspezifische Unterschiede. *M. larici-populina* infizierte alle Klone der Sektionen Tacamahaca, wobei absteigend folgende Reihenfolge festgestellt werden konnte: Nisqually = Androscoggin = Rochester > Weser6 > Max1 > Muhle Larsen > Weser4. Dagegen wiesen nur zwei Klone der Sektion Aigeiros Infektionsmerkmale auf, während drei Klone keinerlei Symptome zeigten: P7 > Aue2 > DN1 = DN5 = D25. Es könnte interessant sein, bedeutende, aber anfällige Tacamahaca-Klone mit den resistenten Aigeiros-Klonen zu kreuzen. Drei Klone aus der Sektion Populus wiesen zwar geringe, aber nachweisbare Infektionsmerkmale auf, während die anderen Klone nicht befallen waren: Astria > Brauna1 > T89 = P1 = Villafranca = W52 = Esch5. Zusätzlich wurden 21 Tage nach Ausbringung des *M. larici-populina*-Sporeninokulats bei verschiedenen Klonen, unabhängig der Sektionszugehörigkeit, nekrotische Bereiche bonitiert, wobei absteigend

Literaturhinweise:

[1] STEENACKERS, J.; STEENACKERS, M.; STEENACKERS, V.; STEVENS, M. (1996): *Poplar diseases, consequences on growth and wood quality. Biomass and Bioenergy* 10(5-6): 267-274. [https://doi.org/10.1016/0961-9534\(95\)00121-2](https://doi.org/10.1016/0961-9534(95)00121-2). [2] DUPLESSIS, S.; CUOMO, C. A.; LIN, Y. C. et al. (2011): *Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. PNAS* 108(22): 9166-9171. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019315108>. [3] GIEFFERS, W.; FLADUNG, M. (1999): *Zur Methodik der Befallsprüfung pathogener Pilze an der Aspe. In: Texte Umweltbundesamt (ed.), Freisetzung transgener Gehölze - Stand, Probleme, Perspektiven, Berlin: 92-97.* [4] BLE (2019): *Die Pappelklone, Klonmischungen und Familieneltern.* https://www.ble.de/SharedDocs/Downloads/DE/Landwirtschaft/Saat-und-Planzgut/Pappelklone_mischungen.pdf?__blob=publicationFile&v=1. [5] ECKENWALDER, J. E. (1996): *Systematics and evolution of Populus. Biology of Populus and its implications for management and conservation. Ottawa, ON, Canada, NRC Research Press: 7-32.* [6] HUSSON, C.; IOOS, R.; ANDRIEUX, A.; FREY, P. (2013): *Development and use of new sensitive molecular tools for diagnosis and detection of Melampsora rusts on cultivated poplar. Forest Pathology* 43(1): 1-11. <https://doi.org/10.1111/efp.12007>. [7] LÜHRS, R.; EFREMOVA, N.; WELTERS, P. et al. (2015): *Entwicklung polyploider Pappellinien von verschiedenen Arten mit Hilfe der Protoplastenfusion. Thünen Report* 26: 185-191. https://literatur.thuenen.de/digbib_extern/dn054931.pdf.

Nekrose *Melampsora larici-populina*

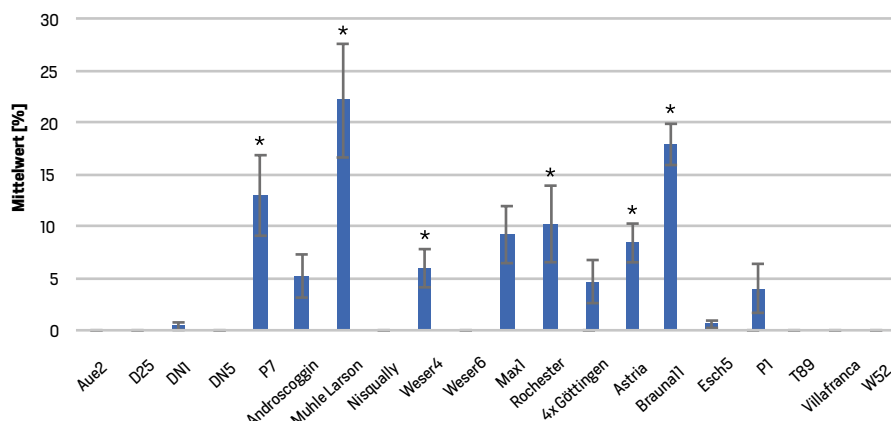


Abb. 5: Mittelwert und Standardfehler (S. E.) der prozentualen, durch Nekrose eingenommenen Fläche ausgewählter Pappelklone am Boniturtag 21 nach Inokulation mit *M. larici-populina*: [*]: 95 % signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Klon P1

Sporenlager *Melampsora larici-tremulae*

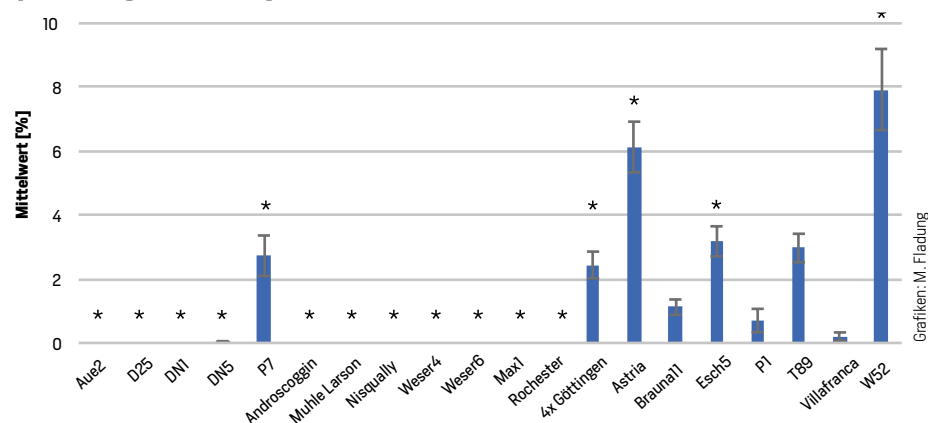


Abb. 6: Mittelwert und Standardfehler (S. E.) der prozentualen, durch Sporenlager eingenommenen Fläche ausgewählter Pappel Klone am Boniturtag 21 nach Inokulation mit *M. larici-tremulae*. [*]: 95 % signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Klon P1

folgende Reihenfolge festgestellt werden konnte: Muhle Larsen > Brauna1 > P7 > Rochester > Max1 > Astria > Weser4 > Adroscoggin > 4x Göttingen > P1 > T89 > Esch5 > DN1 > Nisqually = DN5 = D25 = Aue2 = Weser6 = W52 = Esch5.

Dagegen hat *M. larici-tremulae* bevorzugt die Klone der Sektion Populus absteigend in folgender Reihenfolge infiziert: W52 > Astria > Esch5 > T89 > 4x Göttingen > Brauna1 = P1 = Villafranca. Dagegen wiesen die Klone aus der Sektion Tacamahaca sowie die intersektionellen Hybride Max1 und Rochester keine Infektionsmerkmale auf. Die Aigeiros-Klone reagierten wieder unterschiedlich: Klon P7 (*P. nigra*) zeigte sich am anfälligsten gegenüber *M. larici-tremulae*, während DN1 und D25 keine Infektionsmerkmale zeigten: P7 > DN5 > DN1 = D25 = Aue2.



Khira Deecke

war als Doktorandin am Thünen-Institut für Forstgenetik tätig und fertigt zurzeit ihre Dissertationsschrift zur Editierung von chitinbindenden Genen in Pappeln an. Dr. Matthias Fladung (matthias.fladung@thuenen.de) ist stellvertretender Leiter des Thünen-Instituts für Forstgenetik und forscht seit Anfang der 1990er-Jahre zur Genomik und Biotechnologie von Waldbäumen.