

Bakterienwelke – eine rätselhafte Krankheit von Futtergräsern

Roland Kölliker¹, Fabienne Wichmann^{1,2}, Frank-Jörg Vorhölter³, Constanze Conradin¹, Sonja Reinhard¹, Beat Boller¹ und Franco Widmer¹

¹Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, 8046 Zürich, Schweiz

²Yale University, Molecular, Cellular and Developmental Biology, 06511 New Haven, CT, USA

³Universität Bielefeld, CeBiTec, 33615 Bielefeld, Deutschland

Auskünfte: Roland Kölliker, E-Mail: roland.koelliker@art.admin.ch, Tel. +41 44 377 7345



Abb. 1 | Häufige Schnittnutzung kann die Bakterienwelke begünstigen. (Foto: Cornel Stutz, ART)

Einleitung

Bakterienwelke ist eine der wichtigsten Krankheiten unserer Futtergräser und kann in Beständen zu Ertragsverlusten von bis zu 20 % führen (Egli und Schmidt 1982). Verursacht wird die Krankheit durch das Bakterium *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (Xtg). Dieser Krankheitserreger ist der häufigste unter den Pathovaren, welche Futtergräser infizieren, und befällt verschiedene Arten wie *Lolium multiflorum*, *L. perenne*, *Festuca pratensis*, *Phleum pratense* und *Poa pratensis*. Die Krankheit wird vorwiegend über Gewebeverletzungen übertragen. Daher sind Arten wie *L. multiflorum*, die häufig geschnit-

ten werden, besonders gefährdet (Abb. 1). Da Pflanzenschutz in Grasland generell unerwünscht ist und keine wirksamen Mittel bekannt sind, bleibt die Züchtung resistenter oder toleranter Sorten die einzige Möglichkeit, die Krankheit zu kontrollieren. Obwohl durch konsequente Züchtung die Resistenz neuer Sorten stark verbessert werden konnte (Hirschi *et al.* 2010), bleibt die stetige Verbesserung der Bakterienwelke-Resistenz eine grosse Herausforderung (Boller *et al.* 2005). Um auch in Zukunft qualitativ hochwertige Sorten mit guter Resistenz unter den zu erwartenden Umweltbedingungen hervorzubringen, ist eine stetige Verbesserung der Züchtungsprozesse notwendig. Dies bedingt aber ein detail-

liertes Verständnis der Interaktionen von Pathogen und Pflanze. Ziel unserer Untersuchungen ist es, die genetische Kontrolle der Resistenz bei *L. multiflorum* (*Lm*) und der Virulenz bei *Xtg*, das heisst die *Lm* x *Xtg*-Interaktion, zu verstehen und molekulargenetische Hilfsmittel für eine effiziente Resistenzzüchtung zu entwickeln.

Resistenzgene in *L. multiflorum* (*Lm*)

In einer sogenannten Kartierungspopulation von *Lm*, die auf einer Kreuzung einer anfälligen Pflanze der Sorte Adret und einer resistenten Pflanze aus dem Zuchtprogramm der Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon ART basierte, wurde die Resistenz von einer oder wenigen Regionen im Genom kontrolliert (Studer *et al.* 2006). Sowohl im Feld als auch im Gewächshaus erklärte ein solcher Genort zwischen 43 und 84 % der gesamten Resistenz. Dies deutet in der Regel auf eine qualitative, rassenspezifische Resistenz hin, in welcher ein Resistenzgen der Pflanze mit hochspezifischen Virulenzfaktoren bestimmter Bakterienisolate interagiert (Jones und Dangl 2006). Interessanterweise konnten jedoch in einem Vergleich von infizierten und nicht infizierten *Lm*-Pflanzen keine Unterschiede in der Expression von bekannten, spezifischen Resistenzgenen gefunden werden (Wichmann *et al.* 2011a). Hingegen wurden verschiedene Gene, welche in unspezifischen Resistenzreaktionen wichtig sind, in infizierten Pflanzen stärker exprimiert. Daher war das erste Ziel der vorliegenden Studie zu klären, ob es sich bei der *Lm* x *Xtg*-Interaktion um eine rassenspezifische oder um eine auf unspezifischen Mechanismen beruhende Resistenz handelt.

Virulenzfaktoren bei *X. t. pv. graminis* (*Xtg*)

Um eine Pflanze zu kolonisieren, ihrer Immunreaktion zu entgehen und um Nährstoffe von ihr zu beziehen, produzieren Pathogene sogenannte Effektorproteine, welche über spezifische Sekretionssysteme ausgeschieden werden. Die Komponenten dieses Systems werden als Virulenzfaktoren bezeichnet. Bei Xanthomonaden ist das Typ-3-Sekretionssystem (T3SS) verantwortlich für die Sekretion von verschiedensten Effektorproteinen (Büttner und Bonas 2010), die oft Bestandteil einer rassenspezifischen Pathogen-Erkennung mit anschliessender Resistenzreaktion sind. Obwohl es Ähnlichkeiten zwischen den Virulenzfaktoren innerhalb der Xanthomonaden gibt, variieren die Sekretionsmechanismen und die Effektorproteine stark zwischen Arten und Pathovaren (White *et al.* 2009). Da *Xtg* mit den gut charakterisierten *Xanthomonas*-Arten nur entfernt verwandt ist, kann erwartet werden, dass sich auch die Virulenzfaktoren stark unterscheiden. Das zweite Ziel der vorliegenden

Zusammenfassung

Bakterienwelke an Futtergräsern wird verursacht durch das Bakterium *Xanthomonas translucens* *pv. graminis* (*Xtg*) und führt zu grossen Schäden in Wiesen und Weiden. Um die Züchtung von resistenten Sorten zu unterstützen, untersuchen wir die genetischen Grundlagen der Interaktion zwischen den Bakterien und den Pflanzen. Dabei hat sich gezeigt, dass diese Interaktion im Vergleich zu anderen durch *Xanthomonas*-Arten hervorgerufene Krankheiten an Reis, Tomate oder Zitrone einige Besonderheiten aufweist. So konnten keine Hinweise auf eine rassenspezifische Interaktion zwischen einzelnen Bakterienisolaten und Pflanzengenotypen gefunden werden, wie sie für klassische Resistenzgene typisch ist. Die Sequenzierung des *Xtg*-Genoms hat gezeigt, dass dieses Pathogen aussergewöhnlich viele Insertionssequenzen besitzt. Zudem unterscheidet sich die Organisation eines wichtigen Virulenzfaktors deutlich von anderen *Xanthomonas*-Arten. Ein spezifisches Ausschalten dieses Virulenzfaktors führte zwar zu weitgehendem Virulenzverlust, die Bakterien waren aber trotzdem in der Lage sich in der Pflanze zu vermehren. Diese Erkenntnisse liefern wertvolle Grundlagen für die Weiterentwicklung von effizienten Zuchtmethoden.



Abb. 2 | Künstliche Infektion mit in Bakteriensuspension getauchter Schere. (Foto: ART)

Studie war zu klären, ob das T3SS für die Virulenz von *Xtg* unabdingbar ist und wir wollten die verschiedenen Komponenten des T3SS charakterisieren.

Material und Methoden

Charakterisierung der Resistenz bei *Lm*

Um zu untersuchen, ob zwischen verschiedenen *Lm*-Genotypen und *X. t. pv. graminis*-Isolaten eine rassenspezifische Interaktion besteht, wurde ein Gewächshausversuch durchgeführt. Für die künstliche Infektion wurden sechs Bakterienisolate (*Xtg3*, *Xtg5*, *Xtg8*, *Xtg9*, *Xtg19*, *Xtg29*) basierend auf unterschiedlicher Virulenz, Herkunft und genetischer Diversität ausgewählt (Kölliker *et al.* 2006). Das Pflanzenmaterial bestand aus zweiundsechzig diversen *Lm*-Genotypen, die aus Sorten, Ökotypen und experimentellen Populationen und basierend auf unterschiedlicher Resistenz gegen Bakterienwelke ausgewählt wurden (Wichmann *et al.* 2011b). Achtzehn Klone jedes Genotyps wurden angezogen und in vier Wiederholungen zu je 372 Pflanzen im Gewächshaus in Einzeltöpfen angepflanzt. Nach acht Wochen wurden die Pflanzen mit jedem der sechs Bakterienisolate infiziert und die Krankheitssymptome wurden 15, 21 und 28 Tage nach der Infektion bonitiert. Die Infektion erfolgte nach der von Rechsteiner *et al.* (2006) beschriebenen Methode, durch Zurückschneiden der Pflanzen mit einer in Bakteriensuspension getauchten Schere (Abb. 2). Basierend auf der Bonitur mit einer Skala von 1 (Pflanze gesund) bis 9 (Pflanze abgestorben) wurde die Fläche unter der Befallskurve (Englisch: *area under disease progress curve*, AUDPC-Wert) berechnet und für die statistische Auswertung verwendet.

Charakterisierung der Virulenz bei *X.t. pv. graminis*

Die Bedeutung des T3SS als Virulenzfaktor von *Xtg* wurde in zwei Ansätzen untersucht. Einerseits wurde ein *Xtg*-Isolat so verändert, dass ihm ein wichtiges Gen zur

Regulation des T3SS fehlte. Diese Mutante wurde auf ihre Fähigkeit, Krankheitssymptome zu verursachen und in der Pflanze zu überleben, geprüft. Andererseits wurde das gesamte Genom von *Xtg* sequenziert und auf das Vorhandensein von T3SS Komponenten untersucht. Für diese Untersuchungen wurde das ART-Standardisolat *Xtg29* (Kölliker *et al.* 2006) verwendet.

Das *hrpG*-Gen ist ein wichtiger, regulatorischer Bestandteil des T3SS bei Xanthomonaden (Büttner und Bonas 2010). Basierend auf der *hrpG*-Sequenz von *Xtg29* wurde ein Genkonstrukt $\Delta hrpG$ erstellt, das nur aus den flankierenden Sequenzen, nicht aber aus den eigentlichen *hrpG*-Gensequenzen bestand. Dieses Konstrukt wurde in den Vektor pCC101 kloniert (Abb. 3; Wichmann *et al.* 2012). *Xtg29* wurde mittels Elektroporation und doppelter homologer Rekombination transformiert und die resultierende Mutante wurde mittels Polymerase Kettenreaktion als $\Delta hrpG$ -Mutante (ohne die *hrpG* Sequenz) verifiziert. Die Virulenz der Mutante und des *Xtg29*-Wildtyps wurde in vier Wiederholungen an einem hochanfälligen *Lm*-Genotypen der Sorte Adret wie oben beschrieben getestet. Zusätzlich wurde in zwei Experimenten die Fähigkeit des Überlebens in der Pflanze untersucht. Dazu wurde 0, 4, 7 und 14 Tage nach der Infektion (Experiment 1) sowie 14, 17, 21 und 28 Tage nach der Infektion (Experiment 2) Blattmaterial von infizierten Pflanzen gesammelt, oberflächensterilisiert und auf Agarplatten ausplattiert. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien pro Gramm Pflanzenmaterial wurde nach sieben Tagen Inkubation bei 28 °C bestimmt.

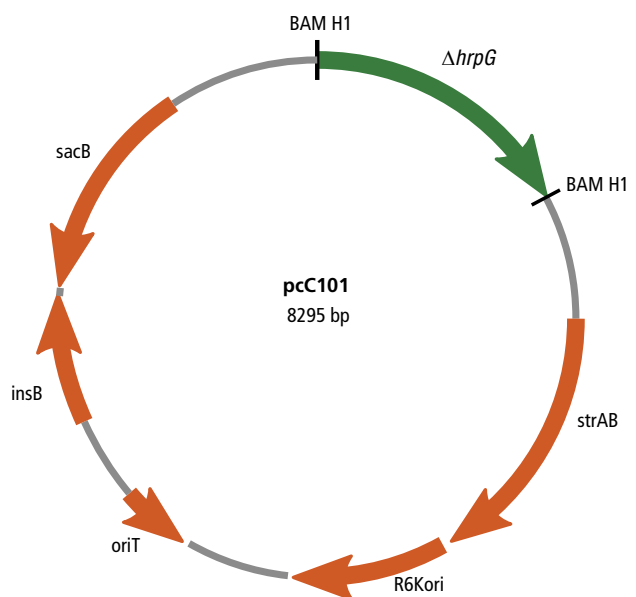


Abb. 3 | Vektor mit dem $\Delta hrpG$ Fragment welcher für die Mutation von *Xtg29* verwendet wurde.

Ein Entwurf des *Xtg29*-Genoms wurde mit Hilfe der 454 Sequenzierung (Roche) erstellt. DNA und Proteinsequenzen von Bestandteilen des T3SS wurden mit Hilfe von BLASTn, BLASTx und BLASTp (Altschul et al. 1990) mit Sequenzen von anderen Xanthomonaden verglichen.

Resultate

Grosse Variabilität der Resistenz

Die durchschnittlichen Boniturnoten variierten von $2,67 \pm 0,97$ (15 Tage nach der Infektion) bis $3,66 \pm 1,16$ (28 Tage nach der Infektion). Komplette Resistenz wurde an keiner Pflanze beobachtet. Ein Vergleich der AUDPC-Werte über alle sechs Isolate zeigte, dass sowohl die Resistenz der *Lm*-Genotypen als auch die Virulenz der *Xtg*-Isolate stark variierte. Gemessen an der Fähigkeit, Krankheitssymptome hervorzurufen, zeigte das Isolat *Xtg9* die grösste und das Isolat *Xtg3* die geringste Virulenz, während *Xtg29* eine mittlere bis hohe Virulenz aufwies (Abb. 4). Die mittlere Resistenz gegen alle sechs Bakterienisolate war für die Genotypen G-04 (Ökotyp), L-03 (Sorte Axis) und B-01 (Sortenkandidat) mit AUDPC-Werten von 30,1 bis 31,4 am grössten. Die drei Genotypen K-01 bis K-03 (Sorte Adret) zeigten die geringste mittlere Resistenz mit AUDPC-Werten von 77,3 bis 83,7. Eine Einteilung der Genotypen in drei Klassen mit der Einteilung anfällig ($AUDPC \geq 60$), mittelanfällig ($60 <$

Tab. 1 | Varianzanalyse der AUDPC (Fläche unter der Befallskurve) Werte von 62 *L. multiflorum* (*Lm*) Genotypen die mit sechs *X. t. pv. graminis* (*Xtg*) Isolaten infiziert wurden (aus Wichmann et al. 2011b)

Variationsquelle	FG	MQ	F-Wert
Wiederholung	3	4725	62,94***
<i>Lm</i> Genotyp	61	2941	39,18***
<i>Xtg</i> Isolat	5	999	13,31***
<i>Lm</i> Genotype x <i>Xtg</i> Isolat	305	63	0,95 ^{ns}
Fehler	1113	75	

*** $P < 0,001$, ^{ns} $P \geq 0,05$

$AUDPC > 39$) und resistent zeigte ($AUDPC \leq 39$), dass nur zwei Genotypen resistent gegen ein oder mehrere Isolate und gleichzeitig anfällig gegen andere Isolate waren. Die anderen 60-*Lm*-Genotypen zeigten entweder die gleiche Reaktion gegen alle Isolate oder unterschieden sich in höchstens einer Resistenzklasse. Obwohl der Einfluss sowohl der *Lm*-Genotypen als auch der *Xtg*-Isolate statistisch hoch signifikant war, konnte keine signifikante Interaktion zwischen *Lm*-Genotypen und *Xtg*-Isolaten nachgewiesen werden (Tab. 1).

Bedeutung und Komponenten des T3SS bei *Xtg*

Durch eine doppelte homologe Rekombination mit dem Vektor pCC101 (Abb. 2) konnte eine $\Delta hrpG$ -Mutante erstellt werden, die das regulatorische HrpG-Protein

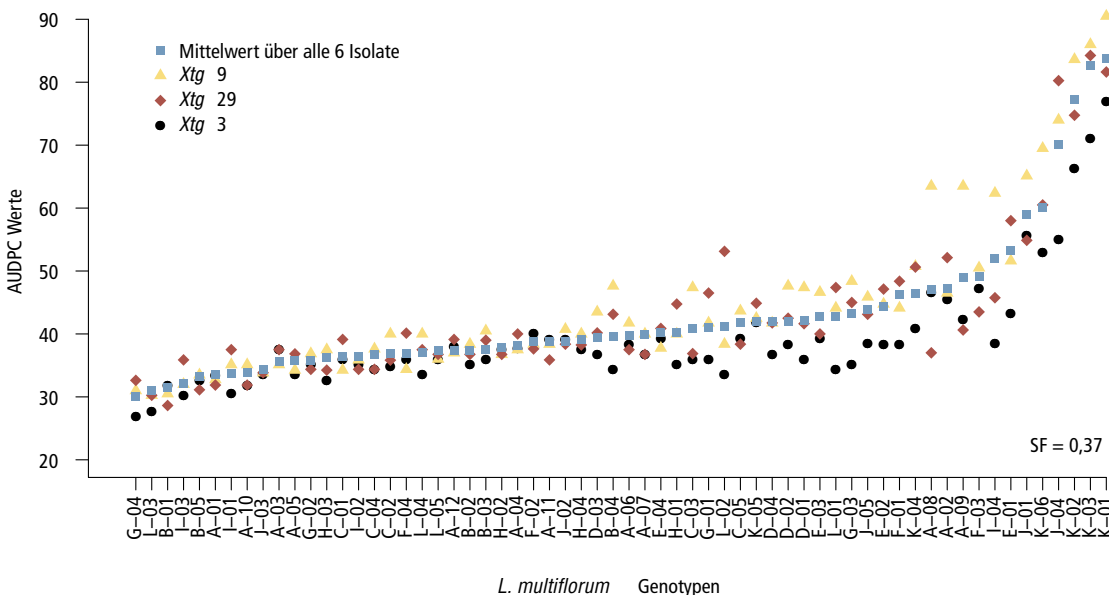


Abb. 4 | Mittlere Resistenz von 62 *Lm* Genotypen auf sechs *Xtg* Isolate und auf die Isolate *Xtg3*, *Xtg9* und *Xtg29* (nach Wichmann et al. 2011b).

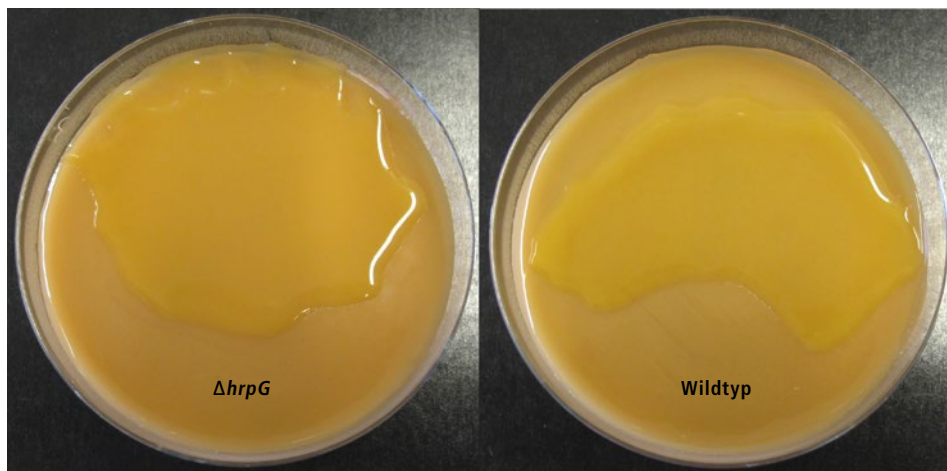


Abb. 5 | Wuchsform der $\Delta hrpG$ Mutante und des Xtg29 Wildtyp auf Agar.

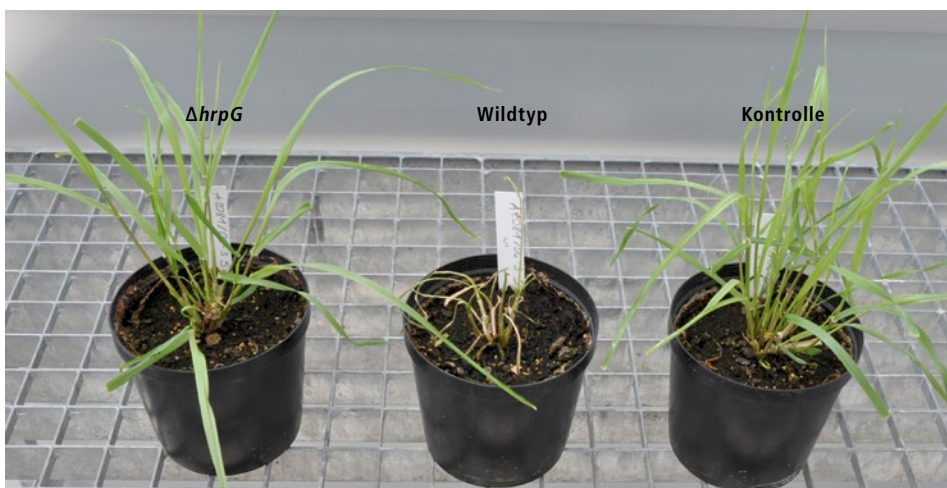


Abb. 6 | Krankheitssymptome verursacht durch den Xtg29 Wildtyp; keine klaren Symptome bei der $\Delta hrpG$ Mutante und der H₂O Kontrolle.

nicht mehr produzieren kann. Mit PCR konnte gezeigt werden, dass dieser Mutante die Sequenz des *hrpG*-Genes fehlte. Die Mutante unterschied sich im Wuchstyp auf Agar nicht vom Xtg29-Wildtyp (Abb. 5). Hingegen verursachte die $\Delta hrpG$ -Mutante keine oder nur sehr geringe Symptome an anfälligen *Lm*-Genotypen (Abb. 6). Während die Symptome verursacht durch den Wildtyp eine Resistenznote von $3,25 \pm 1,71$ (7 Tage nach Infektion) bis $5,5 \pm 1,73$ (28 Tage) erreichten, lagen die Werte für die $\Delta hrpG$ -Mutante zwischen $1,00 \pm 0,58$ und $2,50 \pm 0,58$ (Abb. 7). Um festzustellen, ob die Mutanten überhaupt in der Lage sind in der Pflanze zu überleben, wurden Rückisolationen vorgenommen. Sechs Stunden nach Infektion (Tag 0) lag die Populationsdichte in den mit $\Delta hrpG$ infizierten Pflanzen 10% tiefer als in jenen mit dem Wildtyp infizierten (Abb. 8). Bis zum Tag 7 nahm

die Dichte bei beiden Isolaten stark zu lag aber bei $\Delta hrpG$ mit einem \log_{10} Wert von $8,51 \pm 0,50$ rund 55% tiefer als beim Wildtyp ($9,31 \pm 0,20$). In der späteren Entwicklungsphase nahm die Populationsdichte bei beiden Isolaten tendenziell ab, wobei beim Wildtyp nach 21 Tagen ein leichter Wiederanstieg zu beobachten war (Abb. 8).

Eine vorläufige Analyse der Genomsequenz von Xtg29 ergab eine geschätzte Genomgrösse von 5,01 Megabasen. Verschiedene Genregionen wiesen grosse Ähnlichkeiten zu anderen *Xanthomonas*-Arten auf. Die wichtigsten bekannten Komponenten des T3SS wurden auch im Xtg29-Genom gefunden (Abb. 9). Im Gegensatz zu anderen Xanthomonaden liegen jedoch die regulatorischen Gene *hrpG* und *hrpX* direkt im *hrp*-Gencluster und nicht in einem separaten Cluster ausserhalb (Abb. 9). Eine ähnliche Anordnung wurde bei *Ralstonia solanace-*

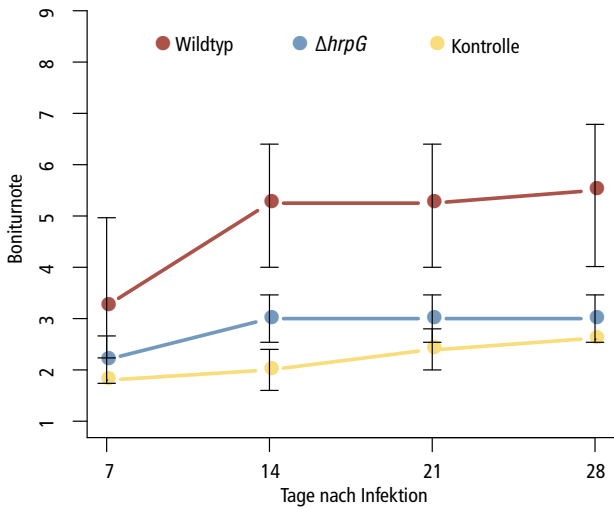


Abb. 7 | Resistenz eines anfälligen *Lm* Genotypen infiziert mit dem *Xtg29* Wildtyp, der $\Delta hrpG$ Mutante und mit H_2O (Kontrolle). Bonitur Werte reichen von 1 (resistent) bis 9 (anfällig).

arum, dem Verursacher von Bakterienwelke auf Nachtschattengewächsen, gefunden, wo das *hrpB* dem *hrpX* von Xanthomonaden entspricht.

Diskussion und Schlussfolgerung

Keine klaren Hinweise auf Rassenspezifität

Ein detailliertes Verständnis über die Existenz von rassenspezifischen Resistenzmechanismen ist wichtig für eine nachhaltige Kontrolle von Bakterienwelke in Graslandsystemen. Da rassenspezifische Resistenz nor-

malerweise nur gegen bestimmte Pathogen-Populationen wirksam ist, können genetische Veränderungen im Pathogen oder die Migration von Pathogenen aus andern Regionen zur Wirkungslosigkeit der Resistenz führen. Wir konnten keinen signifikanten Einfluss der Interaktion zwischen *Lm*-Genotypen und *Xtg*-Isolaten nachweisen. Zudem variierte die Resistenz mehr oder weniger kontinuierlich über alle 62 untersuchten Genotypen, unabhängig von den eingesetzten Bakterienisolaten. Dies deutet stark darauf hin, dass nicht rassenspezifische Resistenzgene, sondern unspezifische Resistenzmechanismen primär für die Resistenz von *Lm* gegen Bakterienwelke verantwortlich sind. Rassenspezifische Interaktionen in anderen *Xanthomonas*-Arten sind oft begleitet von einer sehr hohen Diversität in den Pathogen-Populationen (Hu et al. 2007). *Xtg*-Populationen hingegen scheinen sich durch eine aussergewöhnlich geringe genetische Variabilität auszuzeichnen (Kölliker et al. 2006). Die grosse genetische Variabilität von *Lm* zusammen mit der Tatsache, dass die Gräser oft in Mischungen mit Leguminosen und Kräutern angebaut werden, könnte zudem dazu führen, dass der Selektionsdruck für die Ausbildung von rassenspezifischen Interaktionen zu gering ist. Selbst beim pilzlichen Krankheitserreger *Puccinia coronata* (Kronenrost), bei dem rassenspezifische Resistenzen bekannt sind, zeigten mehrjährige Versuche an über 30 Standorten in Europa keine regionale oder zeitliche Veränderung der Pilzrassen (Schubiger et al. 2010).

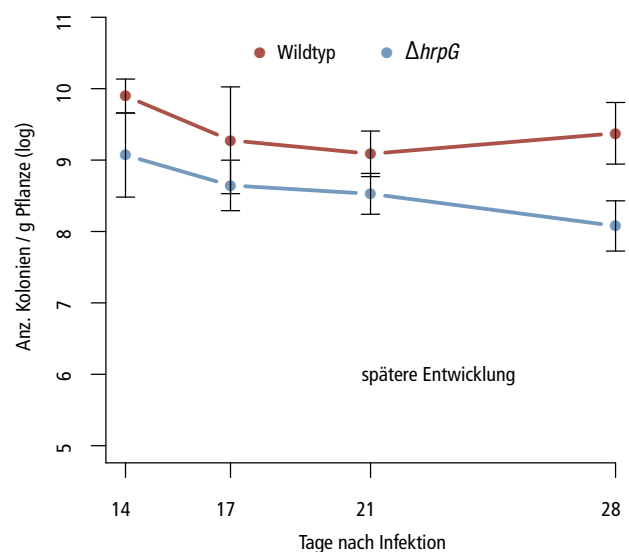
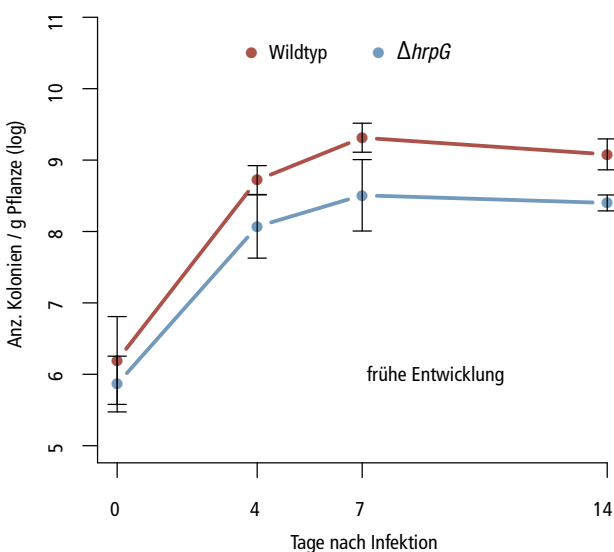


Abb. 8 | Kolonisierung von *Lm* durch den *Xtg29* Wildtyp und die $\Delta hrpG$ Mutante 0 – 14 Tage (frühe Entwicklung) und 14 – 28 Tage (späte Entwicklung) nach Infektion.

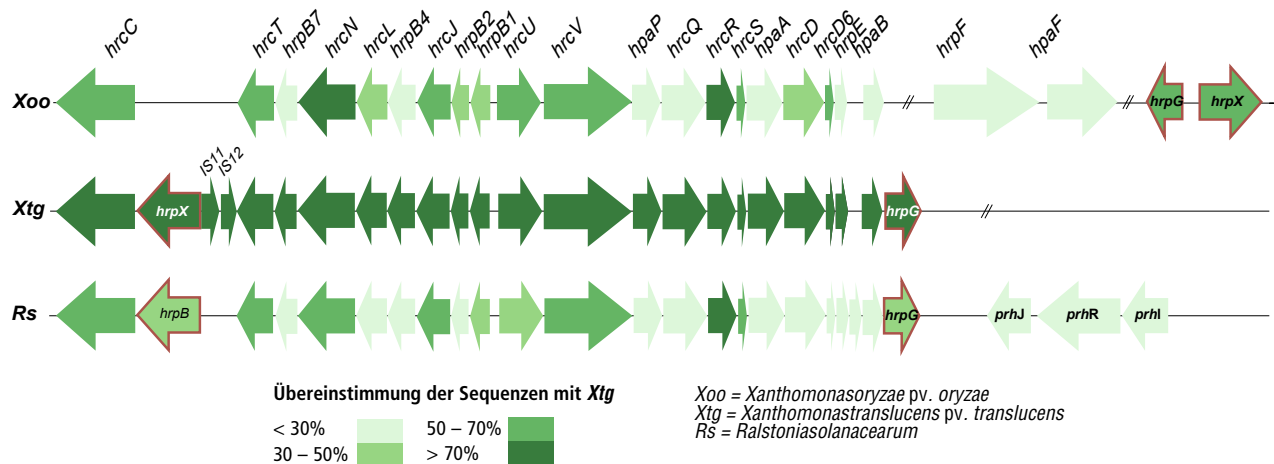


Abb. 9 | Anordnung und Ähnlichkeit von *hrp*, *hrc* und *hpa* Genen von *X. oryzae* pv. *oryzae* (Bakterienfäule bei Reis), *Xtg29* (Bakterienwelke bei Futtergräsern) und *Ralstonia solanacearum* (Bakterienwelke bei Nachtschattengewächsen).

Stark verminderte Virulenz ohne T3SS

Das Fehlen des *hrpG* Gens in *Xtg* hemmte die Symptomentwicklung auf *Lm* stark. Dies ist ein Hinweis dafür, dass ein vollständiges T3SS für die Pathogenität und Virulenz von *Xtg* wichtig ist. Stark verminderte Symptomentwicklung bei T3SS Mutationen wurde auch für andere *Xanthomonas*-Arten beschrieben (Büttner und Bonas 2010). In der vorliegenden Studie verursachte die Δ *hrpG* Mutante von *Xtg* aber dennoch schwache, klar von der Kontrolle unterscheidbare Symptome. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass neben dem T3SS auch andere Virulenzfaktoren wie extrazelluläre Polysaccharide oder durch das Typ 2 Sekretionssystem sekretierte Proteine für die Virulenz eine Rolle spielen. Erstaunlicherweise vermehrte sich die Δ *hrpG* Mutante in der Pflanze fast gleich stark wie der *Xtg29* Wildtyp. Dies zeigt, dass das T3SS für das Überleben von *Xtg* nicht notwendig ist.

Xtg – ein einzigartiger Xanthomonad

In *Xtg* wurden die meisten Komponenten des T3SS gefunden. Die Anordnung der regulatorischen Elemente *hrpG* und *hrpX* ist jedoch einzigartig. Bei allen anderen sequenzierten *Xanthomonas*-Arten befinden sich diese Gene klar ausserhalb des *hrp* Genclusters. Diese spezielle Anordnung lässt eine mögliche Ähnlichkeit der Virulenzmechanismen mit *Ralstonia solanacearum* vermuten. Obwohl die Sequenzen der *hrc*, *hrp* und *hpa* Gene von *Xtg* ähnlicher sind zu jenen der Xanthomonaden als zu jenen von *R. solanacearum*, unterscheiden sie sich doch auch deutlich von ersteren.

Unsere Untersuchung hat gezeigt, dass sich die Resistenz- und Virulenzmechanismen in der *Lm* x *Xtg* Interaktion in vielerlei Hinsicht von jenen in anderen durch Xanthomonaden verursachten Krankheiten unterscheiden. Obwohl keine rassenspezifischen Resistenzgene identifiziert werden konnten, deutet die Bedeutung des T3SS für die Virulenz auf eine wichtige Rolle von sekretierten Effektoren hin. ■

Riassunto

Batteriosi vascolare: una malattia enigmatica delle graminacee foraggere

Nelle graminacee foraggere, la batteriosi vascolare è scatenata dal batterio *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (*Xtg*) e genera ingenti danni a pascoli e prati. Al fine di selezionare varietà resistenti, si è condotta un'analisi sulle basi genetiche dell'interazione tra batteri e piante, dalla quale è emerso che tale interazione presenta alcune particolarità rispetto ad altre malattie di riso, pomodori o limoni causate da specie *Xanthomonas*. Non si sono potute individuare, pertanto, indicazioni su un'interazione caratteristica della razza tra i singoli isolati di batteri e i genotipi delle piante, come tipicamente accade per i geni classici della resistenza. Dal sequenziamento del genoma *Xtg* è emerso che, stranamente, tale patogeno ha molte sequenze di inserzione. Inoltre, l'organizzazione di un importante fattore di virulenza si differenzia nettamente da altre specie di *Xanthomonas*. Una soppressione specifica di tale fattore di virulenza ha sì generato un'ingente perdita di virulenza, ma i batteri erano ancora in grado di riprodursi nella pianta. Tali risultati forniscono basi preziose per lo sviluppo di efficaci metodi di selezione.

Literatur

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal Of Molecular Biology* **215** (3), 403–410.
- Boller B., Schubiger F.X., Tanner P., Streckeisen P., Herrmann D. et al., 2005. La diversité génétique dans les prairies naturelles suisses et son utilisation en sélection. *Fourrages* **182**, 263–274.
- Büttner D. & Bonas U., 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *Fems Microbiology Reviews* **34** (2), 107–133.
- Egli T. & Schmidt D., 1982. Pathogenic variation among the causal agents of bacterial wilt of forage grasses. *Phytopathologische Zeitschrift* **104** (2), 138–150.
- Hirschi H.-U., Frick R. & Bertossa M., 2010. Liste der empfohlenen Sorten von Futterpflanzen 2011–2012. *Agrarforschung Schweiz* **1** (10), Beilage.
- Hu J., Zhang Y., Qian W. & He C.Z., 2007. Avirulence gene and insertion element-based RFLP as well as RAPD markers reveal high levels of genomic polymorphism in the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Systematic and Applied Microbiology* **30** (8), 587–600.
- Jones J.D.G. & Dangl J.L., 2006. The plant immune system. *Nature* **444** (7117), 323–329.
- Kölliker R., Kraehenbuehl R., Boller B. & Widmer F., 2006. Genetic diversity and pathogenicity of the grass pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. *Systematic and Applied Microbiology* **29** (2), 109–119.
- Rechsteiner M.P., Widmer F. & Kölliker R., 2006. Expression profiling of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) during infection with the bacterial wilt inducing pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. *Plant Breeding* **125** (1), 43–51.

Summary

Bacterial wilt – a puzzling disease of forage grasses

Bacterial wilt of forage grasses is caused by the bacterium *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (*Xtg*) and leads to major damage in meadows and pastures. To support the breeding of resistant cultivars, we are studying the genetic bases of the interaction between bacteria and plants. In doing so, we have learnt that this interaction exhibits a number of unique features when compared with other diseases of rice, tomatoes or lemons caused by *Xanthomonas* species. For one thing, no indications were found of a strain-specific interaction between individual bacterial isolates and plant genotypes, as is characteristic for typical resistance genes. The sequencing of the *Xtg* genome has shown that this pathogen possesses an unusually high number of insertion sequences. In addition, the organisation of an important virulence factor differs noticeably from other *Xanthomonas* species. Although knock-out mutation of this virulence factor led to a significant reduction of virulence, the bacteria were still able to reproduce in the plant. These findings provide valuable bases for the further development of efficient breeding methods.

Key words: bacterial wilt, resistance genes, virulence factors.

- Schubiger F.X., Baert J., Bayle B., Bourdon P., Cagas B. et al., 2010. Susceptibility of European cultivars of Italian and perennial ryegrass to crown and stem rust. *Euphytica* **176** (2), 167–181.
- Studer B., Boller B., Herrmann D., Bauer E., Posselt U.K. et al., 2006. Genetic mapping reveals a single major QTL for bacterial wilt resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Theoretical and Applied Genetics* **113** (4), 661–671.
- White F., Potnis N., Jones J. & Koebnik R., 2009. The type III effectors of *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology* **10** (6), 749–766.
- Wichmann F., Asp T., Widmer F. & Kölliker R., 2011a. Transcriptional responses of Italian ryegrass during interaction with *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* reveal novel candidate genes for bacterial wilt resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **122** (3), 567–579.
- Wichmann F., Widmer F., Vorhölter F.-J., Boller B. & Kölliker R., 2012. Breeding for resistance to bacterial wilt in ryegrass: insights into the genetic control of plant resistance and pathogen virulence. In: *Breeding strategies for sustainable forage and turf grass improvement* (Eds. S. Barth and D. Milbourne). Springer Science+Business Media, Dordrecht, 37–46.
- Wichmann F., Mueller-Hug B., Widmer F., Boller B., Studer B. et al., 2011b. Phenotypic and molecular characterization indicate no major race-specific interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* and *Lolium multiflorum*. *Plant Pathology* **60** (2), 314–324.