

Identifizierung des Resistenzlocus *Rpv10* gegen den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) aus der asiatischen Wildrebe *Vitis amurensis*

Florian SCHWANDER, Rudolf EIBACH, Eva ZYPRIAN, Reinhard TÖPFER

Resistenz gegen *Plasmopara viticola*

Das Krankheitsbild des Falschen Mehltaus wird bei der Rebe durch *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni verursacht. Dieser pilzartige Erreger (Oomycet) wurde, ebenso wie der Echte Mehltau (*Erysiphe necator*), aus Amerika nach Europa eingeschleppt und nur intensive Pflanzenschutzmaßnahmen können bei den europäischen Rebsorten der Art *Vitis vinifera* L. hohe Ertrags- und Qualitätseinbußen verhindern. Zur Bekämpfung der beiden Mehltaupilze werden in der Europäischen Union ca. 58 % der landwirtschaftlich genutzten Fungizide auf der mit Reben bestockten Fläche eingesetzt. Diese macht jedoch nur etwa 5 % der gesamten landwirtschaftlichen Nutzfläche aus (s. Tab. 1). Dieses unausgewogene Verhältnis verdeutlicht den im Vergleich zu allen anderen Kulturen äußerst intensiven Pflanzenschutz Einsatz bei der Rebe.

Um diesen Aufwand reduzieren zu können, wurden in Züchtungsprogrammen neue Rebsorten mit guten Resistenzeigenschaften gegenüber den Mehltaupilzen entwickelt. Die bisher genutzten *Plasmopara*-Resistenzen sind bei den meisten neuen Sorten auf das Einkreuzen von Resistenzfaktoren aus amerikanischen Wildarten zurückzuführen.

Die am Staatlichen Weinbauinstitut Freiburg gezüchtete Rebsorte SOLARIS (MERZLING x GEISENHEIM 6493) weist ebenfalls sehr gute Resistenzeigenschaften auf, besitzt jedoch nicht die bekannten, auf amerikanische Wildarten zurückgehenden resistenzkorrelierenden molekularen

Tab. 1: Landwirtschaftliche Anbauflächen und Fungizidmengen der Hauptkulturen in der Europäischen Union. Angabe der Mittelwerte von 5 Jahren (1999-2003). Quelle: Eurostat (2007)

	Anbaufläche		Fungizideinsatz	
	ha	%	t	%
Getreide	43974000	59.8	11433	7.5
Mais	10023000	13.6	0	0.0
Raps	7393000	10.1	1035	0.7
Reben	3573000	4.9	88325	58.2
Obst	3119000	4.2	25202	16.6
Zuckerrübe	2304000	3.1	1521	1.0
Kartoffel	2302000	3.1	10497	6.9
Gemüse	794000	1.1	13720	9.0

Marker. Hier sind offensichtlich andere Resistenzgene für die Abwehr von *P. viticola* verantwortlich, die auf das Einkreuzen der asiatischen Wildart *Vitis amurensis* Rupr. zurückzuführen sind. Züchter in der ehemaligen Sowjetunion nutzten die kältefesteste *V. amurensis* als erstes umfangreich in der Rebenzüchtung und auch osteuropäische und chinesische Züchter verwendeten selektierte Typen dieser Wildrebe als Resistenzquelle (BECKER 1981). Weiterführende Kreuzungen zwischen Hybriden mit amerikanischen Resistenzeigenschaften und *V. amurensis* Resistenzträgern ergaben bereits neue Sorten (z. B. BRONNER, SOLARIS, VIKTOR) und vielversprechendes Zuchtmaterial mit hoher Resistenz und guten weinbaulichen Eigenschaften (CSIZMAZIA 1993; BECKER 1996; KOZMA 2000; HOFFMANN *et al.* 2007).

Markergestützte Selektion in der Züchtung

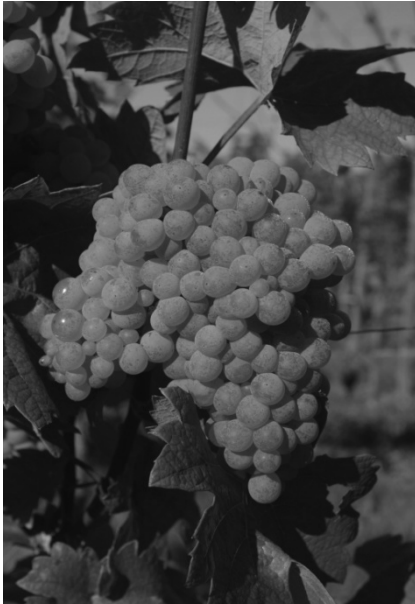
Die Entwicklung von pathogenresistenten und zugleich qualitativ hochwertigen Rebsorten erfordert im Rahmen der konventionellen Züchtung 25 bis 30 Jahre. Es ist zu erwarten, dass diese Zeitspanne mit Hilfe der Anwendung von molekularen Markern zukünftig um bis zu 10 Jahre verkürzt werden kann. Die markergestützte Selektion ermöglicht darüber hinaus eine gezielte Kombination verschiedener Resistenzmechanismen in einer neuen Sorte (Pyramidisierung), was eine breite und dauerhafte Resistenz erwarten lässt (EIBACH *et al.* 2007).

Um die in SOLARIS beobachtete *Plasmopara*-Resistenz in der markergestützten Züchtung verwenden zu können, muss der Genort (Locus), welcher für die Resistenzausprägung verantwortlich ist, identifiziert werden. Molekulare Marker, die nah an diesem Locus liegen und damit gemeinsam (gekoppelt) vererbt werden, können in der Züchtung zur Selektion eingesetzt werden.

Die Kreuzungspopulation

Anhand der Varianz eines Merkmals in einer Kreuzungspopulation lässt sich über eine QTL-Analyse („quantitative trait locus“) der Genabschnitt (Locus) ermitteln, der für die Merkmalsausprägung verantwortliche Faktoren trägt. Für die hier vorgestellten Untersuchungen wurde eine Nachkommenschaft aus der Kreuzung des Zuchtstammes Gf.Ga-52-42 mit der Ertragssorte SOLARIS mit 265 Individuen verwendet (Abb. 1).

Gf.Ga-52-42



(Bild: JKI, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof)

SOLARIS



(Bild: Staatliches Weinbauinstitut Freiburg)

X

Abb. 1: Trauben der beiden Kreuzungseltern.

Der Zuchstamm Gf.Ga-52-42 (BACCHUS x VILLARD BLANC) ist aus der Resistenzzüchtung des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof hervorgegangen und besitzt den bekannten resistenzkorrelierten *Plasmopara*-Resistenzmarker amerikanischer Wildarten, den auch die Sorte REGENT trägt (*Rpv3*). (FISCHER *et al.* 2004; WELTER *et al.* 2007; BELLIN *et al.* 2009). Gemeinsam mit der aus *V. amurensis* stammenden *Plasmopara*-Resistenz in SOLARIS sind in der bearbeiteten Kreuzungspopulation Resistenzeigenschaften vorhanden, die sowohl auf asiatische als auch auf amerikanische Wildarten zurückzuführen sind. Von besonderem züchterischem Interesse sind dabei die Individuen der Kreuzungspopulation, welche eine Kombination der Resistenzen aufweisen und somit diesbezüglich pyramidiert sind.

Ermittlung der Resistenzausprägung

Eine QTL-Analyse basiert auf der genetischen Karte einer Kreuzungspopulation, welche mit den erhobenen phänotypischen Daten des untersuchten Merkmals (hier der *Plasmopara*-Resistenz) verrechnet wird. Die Resistenz einer Rebe gegen *P. viticola* lässt sich über einen standardisierten Blattscheibentest mit künstlicher Infektion zuverlässig ermitteln.

In der Literatur wird belegt, dass die Daten gute Korrelationen zu denen von natürlichem Befall im Weinberg, künstlich infizierten Topfpflanzen und abgetrennten, künstlich infizierten

Blättern aufweisen (EIBACH *et al.* 1989; BROWN *et al.* 1999; BOSO *et al.* 2006; BOSO and KASSEMAYER 2008; BELLIN *et al.* 2009). Zudem ist beschrieben, dass die Verwendung von Gewächshauspflanzen, wodurch die Umwelteinflüsse reduziert werden, in Kombination mit dem Blattscheibentest zu einer Verkleinerung des QTL Konfidenzintervalles führt (BELLIN *et al.* 2009).

Die Bewertung der Resistenz-
ausprägung erfolgte eine Woche nach
der Infektion anhand der Anzahl an
gebildeten Sporangienträgern, den
asexuellen Fortpflanzungsorganen
von *P. viticola*. Durch die Bewertung
der Ausbildung von Sporangien-
trägern lässt sich die Fähigkeit des
Pathogens beurteilen, ein Blatt zu

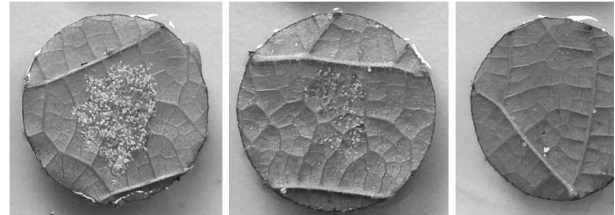


Abb. 2: Beispiele für infizierte Blattscheiben der Boniturnoten 1 (hoch anfällig), 5 (anfällig) und 9 (resistent) (von links nach rechts; 2,5-fach vergrößerte Darstellung).

infizieren, zu besiedeln und neue Sporangien für eine Weiterverbreitung zu bilden. Die Einteilung in fünf Klassen (9: keine, 7: eins bis fünf, 5: sechs bis zwanzig, 3: mehr als zwanzig Sporangienträger, 1: dichter Sporangienträgerteppich), wie sie beispielhaft in Abb. 2 dargestellt sind.

Das in Abb. 3 dargestellte Histogramm zeigt die Varianz des Merkmals *Plasmopara*-Resistenz in der untersuchten Kreuzungspopulation. Die dargestellten Ergebnisse beruhen auf den Mittelwerten von vier unabhängig durchgeführten Blattscheibentests in den Jahren 2009 und 2010. Die Daten entsprechen annähernd einer Normalverteilung mit einem Anteil von 8 % hoch resistenten und 9 % hoch anfälligen Pflanzen. Diese Verteilung ist für die QTL-Analyse besonders geeignet. Dabei ist interessant, dass ein Teil der Nachkommen deutlich höhere Resistenzen aufwiesen, als die Kreuzungseltern.

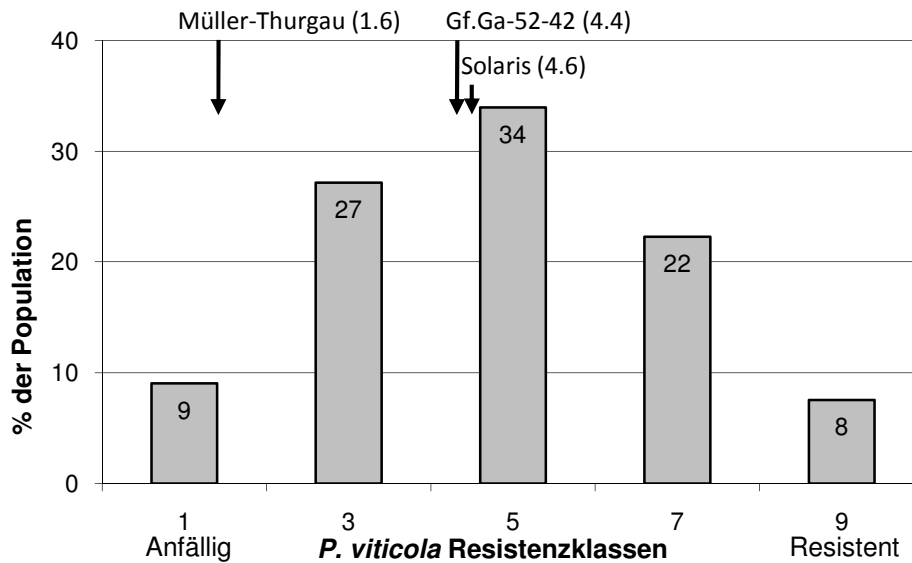


Abb. 3: Häufigkeitsverteilung der *Plasmopara viticola* Resistenzklassen in der Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x SOLARIS. Die Daten basieren auf dem Mittelwert aus vier unabhängigen Bonituren mit je vier Blattscheiben während der Vegetationsperioden 2009 und 2010 an 265 Individuen. Die Pfeile geben die Resistenzbewertungen der Kreuzungseltern sowie der anfälligen Vergleichssorte MÜLLER-THURGAU an (SCHWANDER *et al.* 2011).

Erstellen der genetischen Karte

Für die Kreuzungspopulation wurde eine genetische Karte erstellt. Dabei erfolgt eine statistische Berechnung, bei der die relative Distanz zwischen zwei Markern errechnet wird. Dabei sind die Abstände umso kleiner, je öfter zwei Marker gemeinsam vererbt wurden.

Zunächst wurde eine grobe genetische Karte mit etwa fünf SSR-Markern je Rebenchromosom erstellt. Erste QTL-Analysen mit dieser Karte lieferten bereits Hinweise auf mögliche Resistenzloci. Anschließend konnten gezielt weitere Marker im Bereich der Loci ausgewählt oder neu entwickelt und kartiert werden. Da das Reben genom eines SPÄTBURGUNDERS (PN40024) bekannt ist, wurden diese Informationen genutzt um die neuen Marker speziell für den interessanten Genbereich zu entwickeln. Die dabei entstandene genetische Karte umfasst die Daten von 219 SSR-Markern, deren genetisches Muster an 265 Genotypen der Kreuzungspopulation ermittelt wurde (Abb. 4).

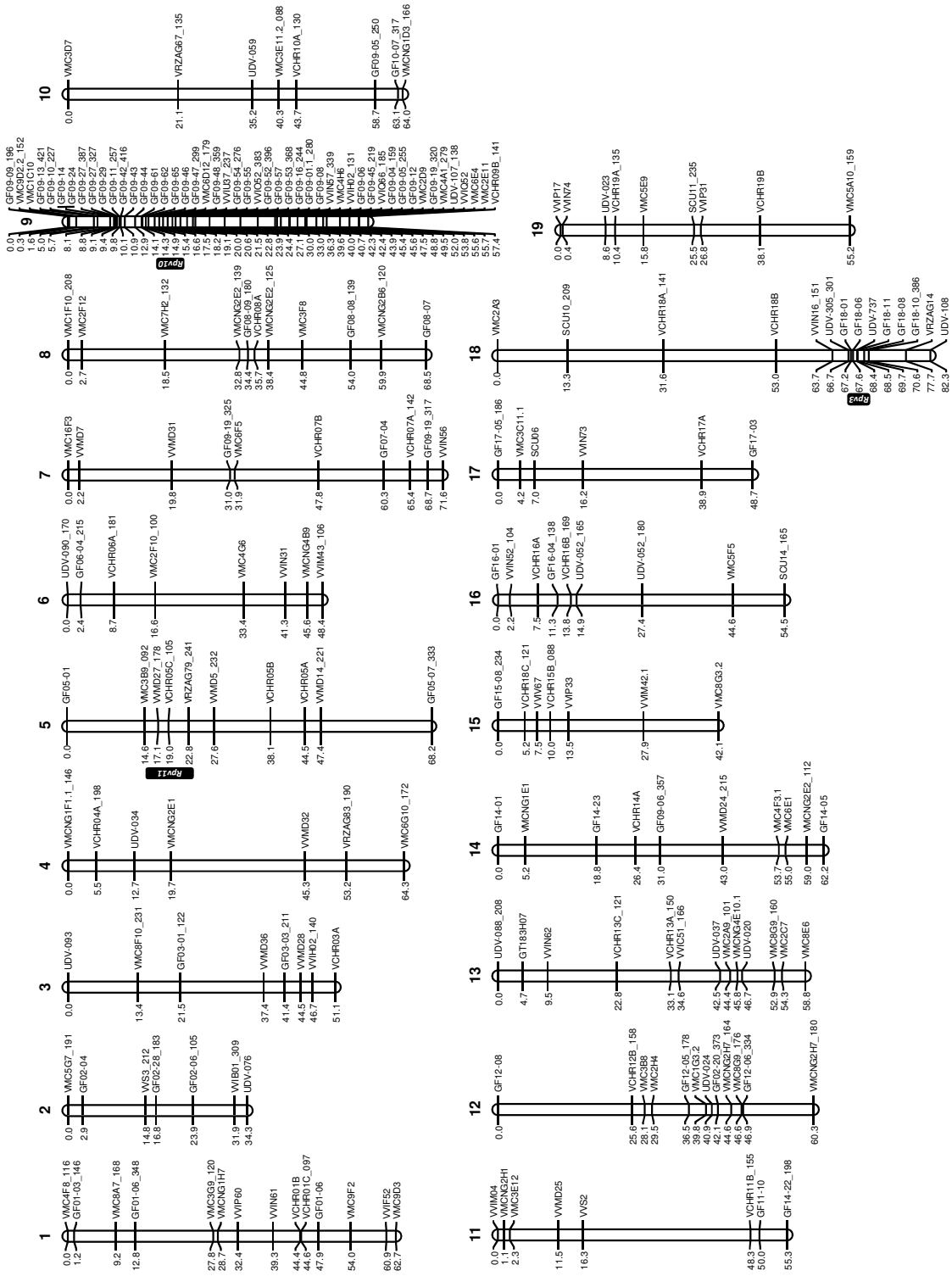


Abb. 4: Integrierte genetische Karte der Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x SOLARIS mit 219 SSR-Markern auf den 19 Kopplungsgruppen der Rebe. Die Population umfasst 265 Individuen. Markerabstände werden in centi Morgan (cM) angegeben. An die Markernamen angehängt sind die kodierten Fragmentlängen (in bp) bei Markern, welche nur in einem Elternteil heterozygot sind. Die drei Resistenzloci sind mit schwarzem Balken markiert.

QTL-Analysen

Die Lokalisierung von Bereichen innerhalb der genetischen Karte, die mit der Merkmalsausprägung für die *Plasmopara*-Resistenz im Zusammenhang stehen, erfolgte über QTL-Analysen. Dabei wird statistisch berechnet, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass die einzelnen genetischen Punkte mit Faktoren der Resistenzausprägung gemeinsam vererbt werden. Aussagekräftige QTL konnten auf den Chromosomen 09 und 18 festgestellt werden und eine schwache QTL befindet sich auf Chromosom 05 (schwarze Balken in Abb. 4).

Mit dem QTL auf Chromosom 09, dessen Bereich wir als *Rpv10*-Locus bezeichnen, lässt sich die Hälfte der beobachteten *Plasmopara*-Resistenz erklären. Durch die große Anzahl an Markern, die in diesem Bereich kartiert wurden konnte der Locus stark eingegrenzt werden. Der *Rpv10*-Locus wurde durch das Elternteil SOLARIS vererbt und stammt ursprünglich von einer asiatischen Wildrebe der Art *Vitis amurensis*, welche 1936 in Russland für eine Kreuzung mit der *V. vinifera*-Sorte SEYANETS MALENGRA verwendet wurde (<http://www.vivc.de> nach Ampelografija of the USSR 1955). Damit konnte ein neuer *Plasmopara*-Resistenzlocus, der einen Befall deutlich reduzieren kann, für die markergestützte Resistenzzüchtung erschlossen werden

Bei dem auf Chromosom 18 festgestellten QTL, der etwa 1/8 der beobachteten *Plasmopara*-Resistenz erklärt, handelt es sich um den in REGENT gefundenen (FISCHER *et al.* 2004; WELTER *et al.* 2007) und als *Rpv3* in BIANCA beschriebenen (BELLIN *et al.* 2009) *Plasmopara*-Resistenzlocus. Diese Resistenz hat das Elternteil Gf.Ga-52-42 von seinem Vater VILLARD BLANC geerbt, der ebenfalls Vorfahre von BIANCA und ein Vollgeschwister von S.V. 12-417, einem Großelternteil von REGENT ist. Als ursprüngliche *Rpv3*-Resistenzquelle wird eine *V. rupestris* Wildrebe aus dem Mittleren Westen der USA vermutet.

Neben den beiden starken QTL konnte ein schwacher QTL auf Chromosom 5 identifiziert werden. An dieser Position wurde bereits durch Fischer *et al.* (2004) ein schwacher QTL in REGENT beschrieben, weshalb wir ihn als *Rpv11* bezeichnen.

Effekt durch Pyramidisierung von Resistenzen

Von besonderem Interesse für die Züchtung sind die Individuen der Kreuzungspopulation, die eine Kombination der beiden starken Resistenzloci aufweisen und somit diesbezüglich pyramidiert sind. Um den Effekt der Pyramidisierung auf die Resistenzausprägung zu untersuchen, wurde die Population anhand des Auftretens bzw. des Fehlens der Resistenzloci *Rpv10* und

Rpv3 in vier Gruppen unterteilt und miteinander verglichen (Abb. 5). In der Gruppe mit beiden Resistenzloci befinden sich vorwiegend Nachkommen mit hoher Resistenz ($\bar{x}6,7 \pm 1,2$) und die Häufigkeitsverteilung ist in Richtung „resistent“ verschoben. Die Nachkommen der beiden Gruppen mit jeweils nur einem Resistenzlocus besitzen eine mittlere Resistenzausprägung. Dagegen ist in der Gruppe mit den Nachkommen ohne Resistenzlocus die höchste Anfälligkeit gegen den Falschen Mehltau zu beobachten ($\bar{x}=2,6 \pm 1,2$).

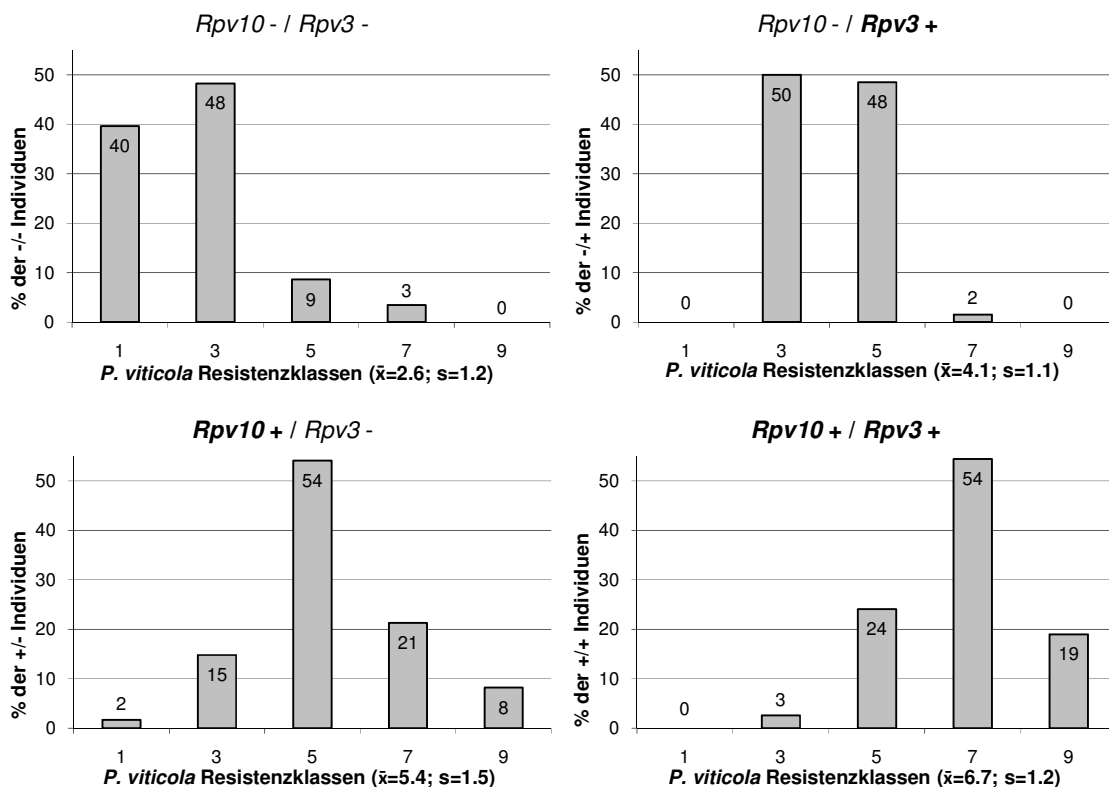


Abb. 5: Häufigkeitsverteilung der Resistenzklassen mit (+) oder ohne (-) den jeweiligen Resistenzlocus *Rpv10* oder *Rpv3* auf Chromosom 18. Mittelwert aller Nachkommen einer Gruppe und die Standardabweichung sind in Klammern angegeben.

Schlussfolgerungen

Die Identifizierung und Lokalisierung neuer Resistenzloci ist die Voraussetzung, um diese in einer effektiven Resistenzzüchtung mit markergestützter Selektion nutzen zu können. Mit dem in diesem Projekt neu beschriebenen *Rpv10*-Locus, welcher ursprünglich aus einer Wildart-Akzession der asiatischen *Vitis amurensis* eingekreuzt wurde, konnte eine neue Resistenzquelle gegen den Falschen Mehltau für die markergestützte Züchtung erschlossen werden. Der *Rpv10*-Locus führt zu einer gut ausgeprägten Resistenz und befindet sich auf Chromosom 09. Der Locus konnte durch spezifische Marker hochauflösend kartiert werden und lässt sich durch die Verwen-

derung eng gekoppelter Marker zuverlässig detektieren. Diese Marker lassen sich in der Züchtung verwenden, um den Locus in genetischen Ressourcen nachzuweisen (Identifikation geeigneter Kreuzungseltern), das Zuchtmaterial auf das Vorhandensein des Locus zu untersuchen (Ersatz der phänotypischen Evaluierung) und Reben mit einer Kombination mehrerer Resistenzloci (Pyramidisierung) im Zuchtmaterial zu identifizieren. Die Kombination der Resistenzloci *Rpv3* und *Rpv10* führte in der Kreuzungspopulation dazu, dass einige der Nachkommen eine höhere Resistenz als die Eltern besitzen. Dies zeigt, dass die Pyramidisierung von Resistenzloci eine erfolgsversprechende Strategie zur Entwicklung neuer Sorten, mit breiten und dauerhaften Resistenzeigenschaften ist.

Literatur

- Ampelografija of the USSR. 1955. Pishchepromizdat, Moscow
- BECKER, H.; 1981: Erste Ergebnisse der Züchtung interspezifischer Ertragssorten mit der Erbmasse der *Vitis amurensis* Ruprecht in Geisenheim. Deutsches Weinbau Jahrbuch **32**, 25-35
- BECKER, N.; 1996: Pilzwiderstandsfähige Rebenneuzuchten des Staatlichen Weinbauinstituts Freiburg. Der Badische Winzer **7**, 25-28; **8**, 27-30; **9**, 18-20
- BELLIN, D.; PERESSOTTI, E.; MERDINOGLU, D.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; ADAM-BLONDON, A. F.; CIPRIANI, G.; MORGANTE, M.; TESTOLIN, R.; DI GASPERO, G.; 2009: Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. Theor. Appl. Genet. **120**, 163-176
- BOSO, S.; KASSEMAYER, H. H.; 2008: Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. *Vitis* **47**, 39-49
- BOSO, S.; MARTINEZ, M. C.; UNGER, S.; KASSEMAYER, H. H.; 2006: Evaluation of foliar resistance to downy mildew in different cv. Albarino clones. *Vitis* **45**, 23-27
- BROWN, M. V.; MOORE, J. N.; FENN, P.; MCNEW, R. W.; 1999: Comparison of leaf disk, greenhouse, and field screening procedures for evaluation of grape seedlings for downy mildew resistance. Hortscience, **34**, 331-333
- CSIZMAZIA, J.; 1993: VIKTOR, Perle von Zala x Kazatshkah - eine Polyvitis-Hybride. Deutsches Weinbau Jahrbuch 1993, 63-66
- EIBACH, R.; DIEHL, H.; ALLEWELDT, G.; 1989. Investigations on the heritability of resistance to *Oidium tuckeri*, *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea* in grapes. *Vitis* **28**, 209-228
- EIBACH, R.; ZYPRIAN, E.; WELTER, L.; TÖPFER, R.; 2007: The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* **46**, 120-124
- Eurostat. The use of plant protection products in the European Union. <http://epp.eurostat.ec.europa.eu> . 5-2-2007.
- FISCHER, B. M.; SALAKHUTDINOV, I.; AKKURT, M.; EIBACH, R.; EDWARDS, K. J.; TÖPFER, R.; ZYPRIAN, E.; 2004: Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. Theor. Appl. Genet. **108**, 501-515
- HOFFMANN, S.; CINDRIC, P.; KOZMA, P.; 2007: Breeding resistant cultivars to downy and powdery mildew. http://www.oiv2007.hu/documents/viticulture/314_breeding_resistente_cultivars_to_1_.pdf . Off. Int. Vigne Vin (O. I. V.), 27.9.2011

- KOZMA, P. Jr.; 2000: Winegrape breeding for fungus disease resistance. Acta Hort. (ISHS) **528**, 511-516
- SCHWANDER, F.; EIBACH, R.; FECHTER, I.; HAUSMANN, L.; ZYPRIAN, E.; TÖPFER, R.; 2011: *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. Theor. Appl. Genet. doi: 10.1007/s00122-011-1695-4: 1-14
- WELTER, L. J.; GÖKTÜRK-BAYDAR, N.; AKKURT, M.; MAUL, E.; EIBACH, R.; TÖPFER, R.; ZYPRIAN, E.; 2007: Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Mol Breed. **20**, 359-374