

Analyse des Resistenzklassikers *Ren3* aus REGENT für Resistenz gegen den Echten Mehltau der Weinrebe

Daniel ZENDLER, Pierre SCHNEIDER, Reinhard TÖPFER und Eva ZYPRIAN

Julius KÜHN-Institut (JKI), Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen

Der PiWi (pilzwiderstandsfähige) Rotwein REGENT stellt eine Erfolgsgeschichte des JKI - Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof dar. Die 1967 gekreuzte Neuzüchtung feierte letztes Jahr ihr 50-jähriges Züchtungsjubiläum. Mit einer Anbaufläche in Deutschland von mittlerweile über 2.000 ha und einer bis zu 70 % reduzierten Pflanzenschutzmittel-Applikation zeigt diese Rebsorte, dass eine Kombination von Pilzwiderstandsfähigkeit und hervorragender Weinqualität heute sehr gut möglich ist. Seit der Kreuzung von REGENT hat sich die Resistenzzüchtung in vielen Bereichen weiterentwickelt und der Züchtungsprozess konnte um nahezu die Hälfte der Zeit reduziert werden. Das Wunderwerkzeug hierbei stellen sogenannte genetische Marker dar, welche einen Fixpunkt im Genom eines Organismus beschreiben, der durch statistische Analysen mit bestimmten morphologischen und physiologischen Eigenschaften der Pflanze gekoppelt werden kann (TÖPFER *et al.* 2011b). Durch Verwendung solcher genetischer Marker war es bereits vor 14 Jahren möglich, die Position der Resistenz gegen den Echten Mehltau in REGENT auf Chromosom 15 zu beschreiben (FISCHER *et al.* 2004). Bei dieser Resistenz handelte es sich zu dieser Zeit um die dritte beschriebene natürliche genetische Resistenz mit Ursprung in Wildrebenarten aus Nordamerika (www.vivc.de Data on breeding and genetics). Der Resistenzlocus *Ren3* (Resistenz gegen *Erysiphe necator*-3) stellt heute in Deutschland eine der wichtigsten Resistenzquellen gegen den Echten Mehltau der Weinrebe dar. Ungefähr 29 zugelassene PiWis tragen diese Resistenz gegen den Echten Mehltau (TRAPP, persönliche Kommunikation).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass durch genaue Analysen und Beobachtungen, gekoppelt mit fortschrittlicheren Analyseverfahren, selbst in dem Resistenzklassiker *Ren3* noch neue Erkenntnisse herausgearbeitet werden können, die relevant für die zukünftige Resistenzzüchtung der Weinrebe sind.

In dem durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projekt *Ren3* war die Zielsetzung die genaue Charakterisierung des viel genutzten und aus REGENT bekannten Resistenzlocus *Ren3* (FISCHER *et al.* 2004; AKKURT *et al.* 2006; WELTER *et al.* 2007). Dies umfasste die Beschreibung des genauen Resistenzmechanismus und die Charakterisierung des für die Resistenz verantwortlichen Gens. Für die Beschreibung des Resistenzmechanismus waren in diesem Fall detaillierte mikroskopische Untersuchungen notwendig, welche mit gewebespezifischen Färbemethoden gekoppelt wurden. Vergleichende Analysen von REGENT, seiner Echten Mehltau-anfälligen Mutter DIANA und dem resistenten Vater CHAMBOURCIN zeigten ein stark vermindertes Wachstum des Pilzes auf den *Ren3*-Trägern REGENT und CHAMBOURCIN (Abb. 1 A). Bei dem Pathogen *Erysiphe necator* handelt es sich um einen Pilz, dessen Nährstoffaufnahme auf lebenden Zellen der Epidermis der Weinrebe beruht (obligat biotroph). Durch sogenannte Haustorien, bei welchen es sich um Organe des Pilzes handelt, die in der Wirtszelle gebildet werden, versorgt sich das Pathogen mit Nährstoffen (ARMIJO *et al.* 2016; WILCOX *et al.* 2015). Die durchgeführten mikroskopischen Analysen zeigten, dass

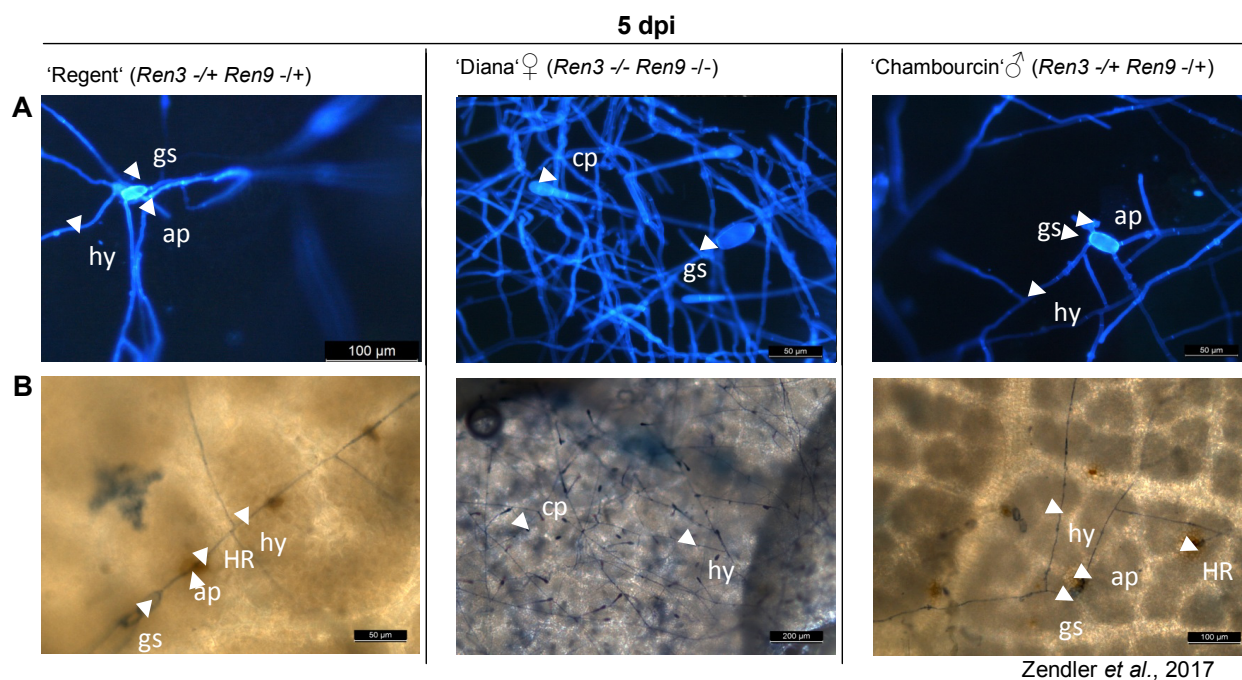


Abb. 1: Färbungen von künstlichen Infektionen mit *E. necator* auf Blättern von REGENT, DIANA und CHAMBOURCIN fünf Tage nach Inokulation. **A:** Calcofluor-White gefärbte Blätter der drei Genotypen. **B:** Trypanblau gefärbte Blätter der drei Genotypen. (gs = gekeimte Spore, hy = Hyphe, ap = Appressorium, cp = Conidiophore, HR = hypersensitive Reaktion) (Foto: JKI Siebeldingen).

Zellen mit dem gebildeten Haustorium und benachbarte Zellen bei *Ren3*-Trägern absterben wodurch die Nährstoffaufnahme des Pilzes verhindert wird (Abb. 1 B, HR; ZENDLER *et al.* 2017). Solche lokal begrenzten Nekrosen, auch „hypersensitive Reaktion“ genannt, stellen einen typischen Resistenzmechanismus gegen den obligat biotrophen Echten Mehltau dar (ARMIJO *et al.* 2016).

Für fast alle heute bekannten und in der Resistenzzüchtung verwendeten natürlichen genetischen Resistenzen gegen den Echten Mehltau, ist eben dieser Resistenzmechanismus beschrieben. Jedoch unterscheiden sich die einzelnen Resistenzloci in ihrer Intensität und Geschwindigkeit mit der die hypersensitive Reaktion einsetzt (QIU *et al.* 2015; PAP *et al.* 2016; ZENDLER *et al.* 2017).

Der zweite Teil der Untersuchung befasste sich mit der Identifikation des Gens, welches die Erkennung des Echten Mehltaus nach Bildung der Haustorien ermöglicht und die Resistenzantwort einleitet. Zu diesem Zweck musste der Bereich auf Chromosom 15 auf einen minimalen Abschnitt eingegrenzt werden um eine Suche nach möglichen Kandidatengenen zu erleichtern. Hierfür wurden Kinder von experimentellen Kreuzungen aus REGENT x LEMBERGER und REGENT x CABERNET SAUVIGNON mithilfe der bereits beschriebenen genetischen Marker untersucht. Der erhaltene genetische Fingerabdruck der untersuchten Kinder der Kreuzungen ist im Idealfall für jedes Kind individuell. Diesen Umstand verdankt man der meiotischen Rekombination während der Bildung der Gameten (Keimzellen und Pollen). Die Rebe ist ein diploider Organismus, sie besitzt somit einen doppelten Chromosomensatz wie der Mensch, wobei ein Chromatid vom Vater und das zweite von der Mutter vererbt werden. REGENT hat durch die Kreuzung von DIANA mit CHAMBOURCIN für Chromosom 15 jeweils ein Chromatid einer anfälligen Rebsorte (DIANA; Mutter) und ein Chromatid einer resistenten Reb-

sorte mit *Ren3* erhalten (CHAMBOURCIN; Vater). Bei den beiden Kreuzungspartnern LEMBERGER und CABERNET SAUVIGNON für die untersuchten Kreuzungspopulationen handelt es sich um anfällige Rebsorten ohne *Ren3*. Dadurch ist bei einer Kreuzung dieser Rebsorten mit REGENT zu erwarten, dass nur ein Teil der Kinder resistent gegen den Echten Mehltau ist. Gemäß den MENDELSchen Gesetzen erhält man bei einer solchen Kreuzung mit einem dominanten Merkmal wie Resistenz eine Verteilung von 1:1 (anfällig:resistent). Bei der Bildung der Keimzellen, die einen einfachen Chromosomensatz besitzen, kann es zu Brüchen der Chromatiden kommen, welche durch sogenannte homologe Rekombination repariert werden.

Dadurch können chimäre Chromatiden entstehen, die bei REGENT zum einen Teil aus dem Chromatid von DIANA und zum anderen aus dem Chromatid von CHAMBOURCIN bestehen. Eine solche Neuordnung der genetischen Sequenz kann an jeder Stelle des Chromatids stattfinden. Je nachdem welcher Teil des CHAMBOURCIN-Chromatids mit dem von DIANA ausgetauscht wird, kann es zum Verlust der Resistenz *Ren3* kommen. Um eine größtmögliche Anzahl an unterschiedlichen chimären Chromatiden zu erhalten, muss die Anzahl der gekreuzten Kinder entsprechend hoch sein. Für die beiden Kreuzungen wurden jeweils 236 Kinder für REGENT x LEMBERGER und 252 Kinder für REGENT x CABERNET SAUVIGNON untersucht. Dabei wurden die genetischen Fingerabdrücke für alle Kinder erhoben. Zusätzlich wurden die Kinder im Feld auf ihre Resistenz gegen den Echten Mehltau beurteilt. Die Merkmalsausprägung „Resistenz gegen den Echten Mehltau“ wurde im Anschluss mit den genetischen Fingerabdrücken in einer sogenannten QTL-Analyse kombiniert. Diese QTL-Analyse wurde verwendet, um die Wahrscheinlichkeit zu berechnen, mit welcher ein bestimmter genetischer Marker auf Chromosom 15 mit dem Merkmal Resistenz gegen den Echten Mehltau korreliert. Bei dieser Untersuchung konnte der bereits bekannte Resistenzlokus *Ren3* in zwei Teile unterteilt werden. Der Teil im mittleren Abschnitt von Chromosom 15 wurde weiterhin mit *Ren3* bezeichnet und der neu identifizierte Bereich im vorderen Teil von Chromosom 15 erhielt die Bezeichnung *Ren9* (FISCHER *et al.* 2004; ZENDLER *et al.* 2017)

Um das Ergebnis der QTL-Analyse zu bestätigen, wurden im Anschluss ausgewählte Kinder der Kreuzungen und Zuchtstämme aus dem Rebensortiment des Geilweilerhofs, nach künstlichen Inokulationen und Färbung der infizierten Blätter, mikroskopisch untersucht. *Ren3* und der bis dahin noch unbekannt Bereich *Ren9* reagierten beide mit einer bereits zuvor erwähnten hypersensitiven Reaktion, assoziiert mit den Appressorien des Pilzes (Abb. 2, braune Bereiche). Der

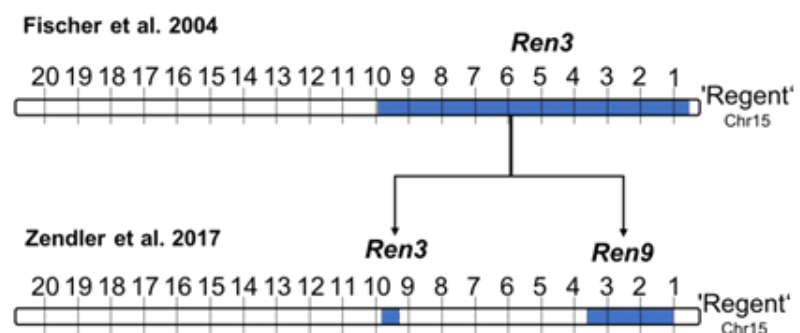


Abb. 2: Schematische Darstellung der Position von *Ren3* in der Publikation von FISCHER *et al.* 2004 und die Aufteilung des Lokus in *Ren3* und *Ren9* in der Publikation von ZENDLER *et al.* 2017. Zahlenangaben neben den schematischen Chromosomen sind in Megabasen (Mb).

Bereich von *Ren3* auf Chromosom 15 konnte durch die Analyse der in Abb. 3 dargestellten Genotypen auf etwa 200 kb eingegrenzt werden (Abb. 3, Marker A, B und C). Dieser kleine genomische Bereich ermöglichte eine Sequenzierung dieses Abschnitts und eine anschließende Suche nach Kandidatengenen die möglicherweise die Resistenz gegen den Echten Mehltau vermitteln (Abb. 4 A) (ZENDLER *et al.* 2017). Der Bereich für *Ren9* im vorderen Teil von Chromosom 15 konnte ebenfalls auf einen Bereich von rund 300 kb eingegrenzt

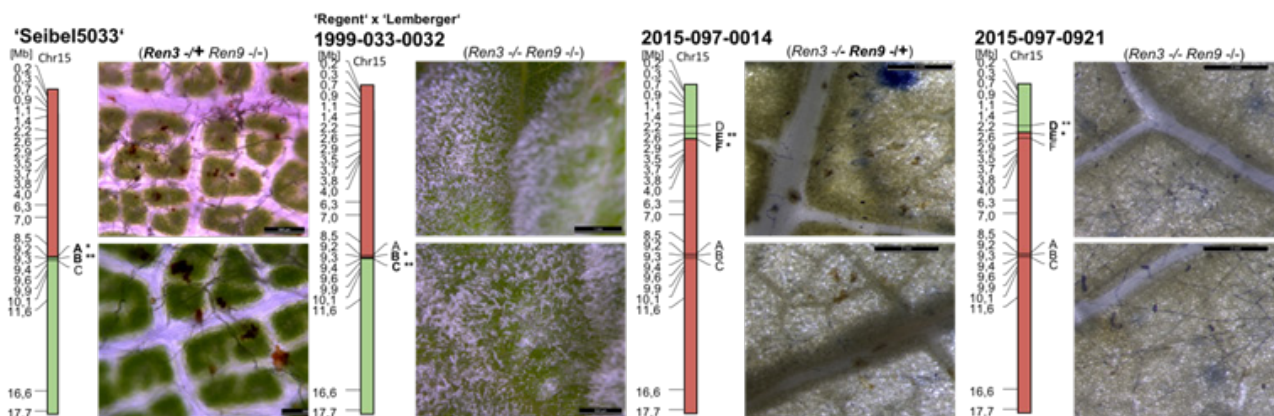


Abb. 3: Künstliche Inokulationen von ausgewählten Genotypen mit Rekombinationen auf Chromosom 15. Neben den mikroskopischen Aufnahmen ist jeweils schematisch Chromosom 15 mit dem jeweiligen Rekombinationspunkt angegeben. Durch diese Individuen konnten die beiden Resistenzloci *Ren3* und *Ren9* auf einen minimalen Bereich auf Chromosom 15 eingegrenzt werden. (A = ScOR-GF15-02, B = GF15-42, C = ScORA7, D = GF15-10, E = Indel-7, F = GF15-08, * = anfällige Allelausprägung, ** = resistente Allelausprägung).

werden (Abb. 3, Marker D, E und F). Dieser Umstand ermöglicht es, in der Zukunft auch diesen Bereich zu sequenzieren und nach möglichen Kandidatengenen zu suchen. Vergleichende Analysen des Bereichs aus REGENT mit dem anfälligen Referenzgenom PN40024 12Xv1 (Selbstung eines PINOT NOIR-Klons; anfällig gegen den Echten Mehltau) identifizierten vier mögliche Kandidatengene einer bereits bekannten Genfamilie, welche in etlichen Pflanzen mit Resistenz gegen die unterschiedlichsten Pathogene assoziiert worden sind (Abb. 4, A) (JAILLON *et al.* 2007). Bei zwei der identifizierten Kandidatengene aus *Ren3* in REGENT konnten größere Unterschiede zum anfälligen Referenzgenom (PN40024 12Xv1) festgestellt werden. Diese Unterschiede führen wahrscheinlich dazu, dass die beiden Gene im anfälligen Genotyp PN40024 nicht funktionell sind. Somit stellen die beiden identifizierten Gene gute Kandidaten dar, welche in REGENT möglicherweise die Resistenz gegen den Echten Mehltau vermitteln (Abb. 4, A).

Bei den beiden Kandidatengenen handelt es sich um die bereits erwähnten NBS-LRR Gene, die auch als Resistenzvermittler für den vielfach benutzten Resistenzlocus *Run1* beschrieben worden sind (Abb. 4, B) (FEECHAN *et al.* 2013). Die beiden Gene besitzen im vorderen Bereich eine sogenannte Coiled-Coil Domäne (CC), welche bekannt ist für Protein-Protein Interaktionen. Die NB-ARC Domäne ist eine aus dem Tierreich bekannte Domäne von Proteinen des Apoptosoms, die beim programmierten Zelltod eine wichtige Rolle spielen. Sie dient als molekularer Schalter zur Hydrolyse von ATP zu ADP. Die Leucine-Rich-Repeat (LRR) Domäne ist ein hoch variabler Bereich, welcher für die Eigeninhibierung und Erkennung von Proteinen des Pathogens verantwortlich ist (Abb. 4, B) (SEKHWAL *et al.* 2015). Bei einer Analyse der differentiellen Transkription dieser Gene, konnte gezeigt werden, dass das Gen *Ren3-4* in REGENT 10 und 24 Stunden nach Inokulation mit dem Echten Mehltau leicht induziert ist (Abb. 4, C). Das Gen *Ren3-1* dagegen war jedoch nicht differentiell reguliert. Beide Gene sind im anfälligen Genotyp CHARDONNAY nicht transkribiert (Abb. 4, C). Alles in allem deuten die erarbeiteten Ergebnisse darauf hin, dass eines der beiden identifizierten Gene die Resistenz gegen den Echten Mehltau vermittelt. Eine eindeutige Aussage kann durch eine funktionelle Analyse der beiden Gene nach Transformation in anfällige Genotypen getroffen werden. Dafür müssen die beiden Gene in z.B. CHARDONNAY oder RIESLING eingebracht werden und anschließend künstliche Inokulationen der transge-

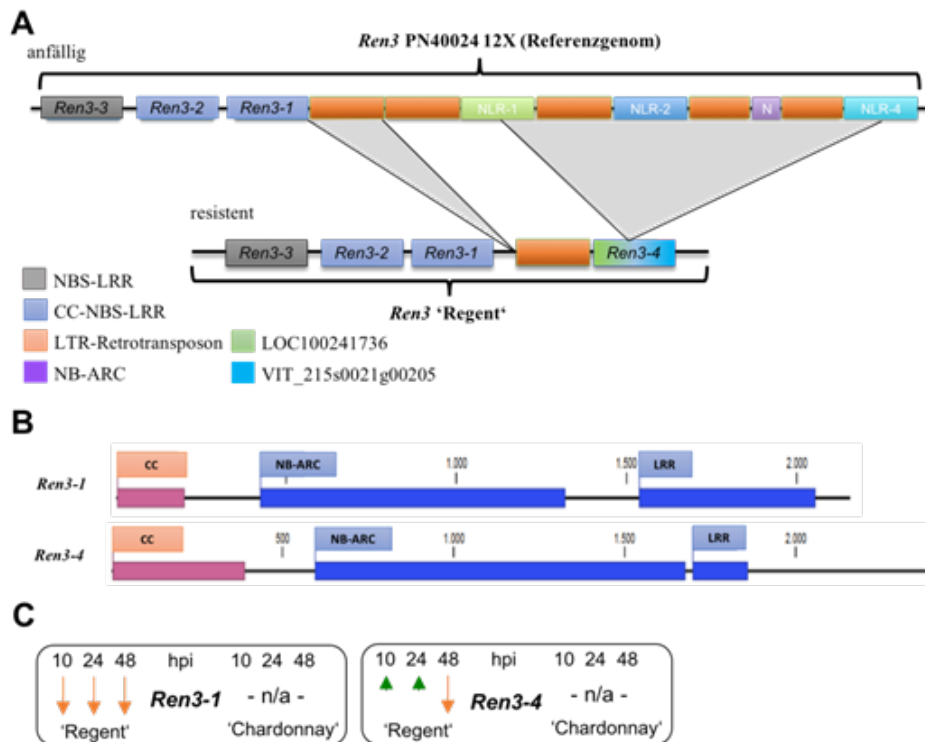


Abb. 4: A: Schematische Gegenüberstellung des sequenzierten Resistenzlokus *Ren3* aus REGENT und dem homologen Bereich aus dem Referenzgenoms des anfälligen Genotyps PN40024 (Selbstung von PINOT NOIR). B: Schematische Darstellung der beiden möglichen Kandidatengene aus *Ren3* mit ihren identifizierten funktionellen Domänen (CC = Coiled-Coil, NB-ARC = Nukleotid-Bindestelle, LRR = Leucin-Rich-Repeat). C: Ergebnisse einer Untersuchung zur Differentiellen Genregulation der beiden identifizierten Kandidatengene nach Inokulation mit dem Echten Mehltau 10, 24 und 48 Stunden nach Inokulation. Es wurden REGENT und CHARDONNAY gegenübergestellt. Es ist die relative Expression zu dem Referenzgen UBC (Ubiquitin Conjugating Enzyme) angegeben. Bei CHARDONNAY war keine Expression der beiden Gene detektierbar (n/a).

nen Pflanzen durchgeführt werden. Zeigen die transgenen Pflanzen eine Resistenz gegen den Echten Mehltau, kann geschlossen werden, dass eines der beiden Gene tatsächlich die Resistenz vermittelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die genaue Analyse des Resistenzklassikers *Ren3* ein zweiter resistenzvermittelnder Bereich identifiziert werden konnte, welcher denselben Mechanismus verwendet wie *Ren3*, um den Echten Mehltau abzuwehren. *Ren9* konnte auch auf einen relativ geringen Bereich eingegrenzt werden, wodurch eine zukünftige Suche nach möglichen Kandidatengenen erleichtert wird. Für *Ren3* konnten zwei Kandidatengene identifiziert werden, die möglicherweise die Resistenz gegen den Echten Mehltau vermitteln.

Literatur

- AKKURT, M.; WELTER, L.; MAUL, E.; TÖPFER, R.; ZYPRIAN, E.; 2006: Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). *Mol. Breed.* **19**, 103-111 (<https://doi.org/10.1007/s11032-006-9047-9>).
- ARMIJO, G.; SCHLECHTER, R.; AGURTO, M.; MUÑOZ, D.; NUÑEZ, C.; ARCE-JOHNSON, P.; 2016: Grapevine pathogenic microorganisms: understanding infection strategies and host response scenarios. *Front. Plant Sci.* **7**, Art. 382 (<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00382>).
- FEECHAN, A.; ANDERSON, C.; TORREGROSA, L.; JERMAKOW, A.; MESTRE, P.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; MERDINOGLU, D.; WALKER, A. R.; CADLE-DAVIDSON, L.; REISCH, R.; AUBOURG, S.; BENTAHAR, N.; SHRESTHA, B.; BOUQUET, A.; ADAM-BLONDON, A. F.; THOMAS, M. R.; DRY, I. B.; 2013: Genetic dissection of a TIR-NB-LRR locus from the wild North American grapevine species *Muscadinia rotundifolia* identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **76**, 661-674 (<https://doi.org/10.1111/tpj.12327>).
- FISCHER, B. M.; SALAKHUTDINOV, I.; AKKURT, M.; EIBACH, R.; EDWARDS, K. J.; TÖPFER, R.; ZYPRIAN, E.M.; 2004: Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theor. Appl. Genet.* **108**, 501-15 (<https://doi.org/10.1007/s00122-003-1445-3>).
- JAILLON, O.; AURY, J. M.; NOEL, B.; POLICRITI, A.; CLEPET, C.; CASAGRANDE, A.; CHOISNE, N.; AUBOURG, S.; VITULO, N.; JUBIN, C.; VEZZI, A.; LEGEA, F.; HUGUENEY, P.; DA SILVA, C.; HORNER, D.; MICA, E.; JUBLOT, D.; POULAIN, J.; BRUYÈRE, C.; BILLAULT, A.; SEGURENS, B.; GOUYVENOUX, M.; UGARTE, E.; CATTONARO, F.; ANTHOUARD, V.; VICO, V.; DEL FABBRO, C.; ALAUX, M.; DI GASPERO, G.; DUMAS, V.; FELICE, N.; PAILLARD, S.; JUMAN, I.; MOROLDO, M.; SCALABRIN, S.; CANAGUIER, A.; LE CLAINCHE, I.; MALACRIDA, G.; DURAND, E.; PESOLE, G.; LAUCOU, V.; CHATELET, P.; MERDINOGLU, D.; DELLEDONNE, M.; PEZZOTTI, M.; LECHARNY, A.; SCARPELLI, C.; ARTIGUENAVE, F.; PÈ, M. E.; VALLE, G.; MORGANTE, M.; CABOCHE, M.; ADAM-BLONDON, A. F.; WEISSENBAACH, J.; QUÉTIER, F.; WINCKER, P.; 2007: The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**, 463-67 (<https://doi.org/10.1038/nature06148>).
- PAP, D.; RIAZ, S.; DRY, I. B.; JERMAKOW, A.; TENSCHER, A. C.; CANTU, D.; OLÁH, R.; WALKER, M. A.; 2016: Identification of two novel powdery mildew resistance loci, *Ren6* and *Ren7*, from the wild Chinese grape species *Vitis piasezkii*. *BMC Plant Biol.* **16**, Art. 170 (<https://doi.org/10.1186/s12870-016-0855-8>).
- QIU WENPING; FEECHAN, A.; DRY, I.; 2015: Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. *Hortic. Res.* **2**, Art. 15020 (<https://doi.org/10.1038/hortres.2015.20>).
- SEKHWAL, M. K.; PINGCHUAN LI; LAM, I.; XIUE WANG, CLOUTIER, S.; YOU, F. M.; 2015: Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 19248–19290 (<https://doi.org/10.3390/ijms160819248>).
- TÖPFER, R.; HAUSMANN, L.; HARST, M.; MAUL, E.; ZYPRIAN, E.; EIBACH, R.; 2011: New horizons for grapevine breeding. *Fruit, Veget. Cereal Sci. Biotechnol.* 79-100.
- WELTER, L. J.; GÖKTÜRK-BAYDAR, N.; AKKURT, M.; MAUL, E.; EIBACH, R.; TÖPFER, R.; ZYPRIAN, E. M.; 2007: Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Mol. Breed.* **20**, 359-74 (<https://doi.org/10.1007/s11032-007-9097-7>).
- WILCOX, W. F.; GUBLER, W. D.; UYEMOTO, J. K.; 2015: *Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests*. 2nd ed. APS Press, St. Paul, USA.
- ZENDLER, D.; SCHNEIDER, P.; TÖPFER, R.; ZYPRIAN, E.; 2017: Fine mapping of *Ren3* reveals two loci mediating hypersensitive response against *Erysiphe necator* in Grapevine. *Euphytica* **213**, Art. 68 (<https://doi.org/10.1007/s10681-017-1857-9>).