

## **Etablierung einer Methode zur Phänotypisierung der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) resistenz in der Weinrebe (*Vitis spec.*)**

Development of a method for phenotyping Black Rot (*Guignardia bidwellii*) resistance on grapevine (*Vitis spec.*)

Rex, F., Fechter, I., Hausmann, L., Töpfer, R.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,

Institut für Rebenzüchtung, Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen

Kontakt: friederike.rex@jki.bund.de, Tel: 0049-(0)6345-41-127

### **Zusammenfassung**

Der Erreger der Schwarzfäule *Guignardia bidwellii* wurde im 19. Jahrhundert aus Nordamerika nach Europa eingeschleppt. Seit 2002 wird der Ascomycet vermehrt in deutschen Weinanbaugebieten beobachtet und führt gebietsweise zu erheblicher Ertragsminderung. Dies gibt Anlass, in Zukunft Schwarzfäule resistente Reben zu züchten. Für die Züchtung ist eine Methode erforderlich, um eine große Anzahl an Reben schnell und zuverlässig bezüglich ihrer Anfälligkeit gegen die Schwarzfäule zu charakterisieren. Vorgestellt wird ein Verfahren der Phänotypisierung der Resistenz in der Rebe, sowie die Durchführung der Bonitur und deren Ergebnisse. Die Bonituren sind darauf ausgerichtet, Daten zu erheben, die für genetische Analysen (hier QTL) verwendbar sind. Letztendlich werden molekulare Marker entwickelt, die eng mit dem Merkmal Schwarzfäule Resistenz gekoppelt sind und daher in der Züchtung zur Frühselektion von Reben verwendet werden können.

Stichwörter: Schwarzfäule, Weinrebe, Züchtung

### **Abstract**

Black Rot of grapevine is caused by the Ascomycet *Guignardia bidwellii*. The pathogen was introduced from North America to Europe in the 19<sup>th</sup> century. Since 2002 increased effects of the disease have been noticed, causing significant yield losses in the region of Mosel and infections in all German wine-growing regions. For that reason, it is important to breed Black Rot resistant grapevine cultivars. A method has been developed to characterize lots of vines in a fast and reliable way concerning their susceptibility. First data have been collected and can be used for genetic analysis (here QTL). The aim of the project is to develop a molecular marker correlating with Black Rot resistance which can be used to select juvenile plants and therefore supporting the breeding of resistant cultivars.

Keywords: Black Rot, Grapevine, Breeding

### **Einleitung**

Die Rebkrankheit Schwarzfäule wird durch den Ascomyceten *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala und Ravaz hervorgerufen. Das ursprünglich in Nordamerika beheimatete Pathogen wird in Frankreich seit 1885 beobachtet. In den deutschen Weinanbaugebieten war es bislang weitgehend unbedeutend. Seit 2002 tritt jedoch ein verstärkter Befall vor allem im Anbaugebiet Mosel auf und verursacht teils erhebliche Schäden (Molitor, 2009; Lipps & Harms, 2004).

Ebenso wie bei den Mehltaupilzen finden sich Resistenzen gegen die Schwarzfäule in amerikanischen Wildarten, nicht aber in der europäischen Kulturrebe *V. vinifera*. Für Mehltairesistenzen konnten bereits molekulare Marker entwickelt (Akkurt et al., 2007; Fischer et al., 2004; Akkurt et al., 2007) und erfolgreich für die Frühselektion von Resistenzeigenschaften eingesetzt werden (Eibach et al., 2007).

Im Rahmen dieses Projektes wird die Basis der Mehltaupilzresistenzen um den Erreger der Schwarzfäule erweitert. Dafür steht die Kreuzungspopulation V3125 x 'Börner' zur Verfügung. Für diese Population wurde die Unterlagssorte und Arthybride 'Börner' (V. riparia x V. cinerea) als Resistenzträger mit dem anfälligen Zuchtstamm V3125 ('Trollinger' x 'Riesling') gekreuzt. Die Individuen der Kreuzungspopulation spalten bezüglich der Resistenz gegen die Schwarzfäule auf. Um das Resistenzverhalten für die Kreuzungseltern und jedem Nachkommen zu ermitteln, wurde ein Resistenztest etabliert.



**Abb.1:** Das Schadbild der Schwarzfäule auf Blättern und Beeren der Weinrebe.

Mit der Evaluierung der Population und der bereits veröffentlichten genetischen Karte (ZHANG et al., 2009) wurden die Grundlagen für QTL-Berechnungen geschaffen, mit denen die Loci im Genom, die für die Resistenz entscheidend sind, lokalisiert werden. Letztendlich soll im Rahmen des FDW-geförderten-Projektes (Forschungsring des Deutschen Weinbaus) ein molekularer Marker, der mit der Schwarzfäule Resistenz korreliert und für moderne Selektionsverfahren in der Rebenzüchtung eingesetzt werden kann, entwickelt werden.

### **Material und Methoden**

Die Kreuzungspopulation V3125 x 'Börner' umfasst etwa 200 Individuen, welche aus den Jahren 1998 und 2001 vom Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof stammen und dort gepflanzt sind. Zusätzlich wurden für die Versuche Topfreben aus Stecklingsvermehrung verwendet.

Für die Infektionsversuche wurde das Isolat Mo05 (Mosel 2005) des Erregers der Schwarzfäule *Guignardia bidwellii* verwendet. Dieses wurde vom DLR Neustadt zur Verfügung gestellt, ebenso wie die Methoden zur Kultivierung und Sporengewinnung (Jailloux, 1992; Molitor, 2009). Das Pathogen wurde auf Hafermehl-Agar im Klimaraum bei Dauerlicht mit 50% Schwarzlicht bei 25°C kultiviert (C. Hoffmann, JKI Siebeldingen, pers. Mitteilung) und die Sporensuspension zwischen der zweiten und dritten Woche nach der Passage gewonnen (Caltrider, 1961). Die Inokulation durch Aufsprühen erfolgte mit einer Konzentration von 104 - 105 Sporen/ml, die zuvor mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde.

Für die Infektionsversuche wurden von der gesamten Kreuzungspopulation durch vegetative Vermehrung Topfreben angezogen. Betrachtet wurden drei Reben je Genotyp, um eine Wiederholung zu gewährleisten. Die anfällige Sorte 'Müller-Thurgau' diente als Kontrolle. Die Topfreben wurden im Klimaraum infiziert und unter Plastikfolien über Nacht bei 25°C inkubiert. Die erste Bonitur erfolgte nach 14 Tagen und eine weitere nach 21 Tagen. Die Bonitur erfolgte als Abschätzung des Verhältnisses der befallenen Blattfläche zur Gesamtblattfläche. Die Infektion der Kreuzungspopulation im Freiland fand auf natürlichem Wege statt. Der Befall der Blätter wurde in vier Klassen bonitiert (0 = kein Befall bis 4 = starker Befall).

### Ergebnisse

Die Kultivierung des Pilzes wurde erfolgreich gemäß Caltrider (1961) und Molitor (2009) am Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof etabliert. Der hemibiotrophe Pilz kann dauerhaft kultiviert und die Sporensuspension bis zu 14 Tagen bei 4°C gelagert werden. Zusätzlich wurde ein Isolat von befallenen Blättern im Freiland am Geilweilerhof (Gf10) gewonnen, welches eine zehnfach höhere Sporulationsaktivität zeigt.

Im Jahr 2009 wurden in Vorversuchen an Topfreben 60 Genotypen der Population V3125 x 'Börner' in dreifacher Wiederholung bonitiert. In diesen bewährte sich der Modus der Bonitur, der innerhalb eines Genotyps zu vergleichbarem Befall führte. Die Bonituren zeigten, dass die Nachkommen der Kreuzungspopulation V3125 x 'Börner' bezüglich der Anfälligkeit gegen Schwarzfäule segregieren.

In der Saison 2010 wurden die Versuche auf die komplette Kreuzungspopulation erweitert und die Reben in drei unabhängigen Durchgängen im Klimaraum infiziert und bonitiert. Der erste Durchgang wurde mit dem Isolat Mo05 durchgeführt, die weiteren Wiederholungen mit einer Mischung aus diesem Isolat und dem neuen Isolat Gf10. Somit stehen insgesamt neun Datenpunkte für jeden Genotyp zur Verfügung. Zusätzlich wurde der natürliche Befall der Kreuzungspopulation im Freiland bonitiert.

### Diskussion und Perspektive

Mit der Kultivierung und Lagermöglichkeit des Pathogens ist die Grundlage für Versuche an Topfreben geschaffen worden. Durch die zusätzliche Verwendung des stärker sporulierenden Isolats Gf10 konnten die Versuche vereinfacht werden. Die Topfreben der Kreuzungspopulation wurden in einer Saison in drei Wiederholungen infiziert und bonitiert. Gleichzeitig konnte 2010 der Befall der Genotypen auch im Freiland bonitiert werden. Nach dem ersten Versuch im Klimaraum zeigte sich, dass sich die befallenen Genotypen im Freiland teilweise nicht mit den befallenen Genotypen der Versuche im Klimaraum deckten. Diese Ergebnisse glichen sich jedoch an, nachdem das Isolat Gf10 verwendet wurde. Im Jahr 2011 erfolgt eine erneute Bonitur der Datensätze. Die phänotypischen Daten werden für QTL-Analysen eingesetzt, die genetische Karte der Population in den betreffenden Bereichen verfeinert und letztendlich molekulare Marker entwickelt, die mit der Resistenz gegen die Schwarzfäule gekoppelt sind und in der Züchtung verwendet werden können.

### Literatur

- Akkurt, M., L. Welter, E. Maul, R. Töpfer, E. Zyprian. (2007): Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). *Molecular Breeding* **19**: 103-111.
- Caltrider P. (1961): Growth and Sporulation of *Guignardia Bidwellii*. *Phytopathology* **51**: 860.
- Eibach R, E. Zyprian, L. Welter, R. Töpfer. (2007): The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* **46**: 120-124.

- Fischer B. M., I. Salakhutdinov, M. Akkurt, R. Eibach, K. J. Edwards, R. Töpfer, E. M. Zyprian. (2004): Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* **108**: 501-515.
- Jailloux F. (1992). Invitro Production of the Teleomorph of *Guignardia-Bidwellii*, Causal Agent of Black Rot of Grapevine. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **70**: 254-257.
- Lipps H. P., M. Harms. (2004): Schwarzfäule - ein neues Problem im deutschen Weinbau. *Die Winzer-Zeitschrift* 19[6], 28-29.
- Molitor D. (2009): Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) an Weinreben. Dissertation
- Zhang J. K., L. Hausmann, R. Eibach, L. J. Welter, R. Töpfer, E. M. Zyprian. (2009): A framework map from grapevine V3125 (*Vitis vinifera* 'Schiava grossa' x 'Riesling') x rootstock cultivar 'Börner' (*Vitis riparia* x *Vitis cinerea*) to localize genetic determinants of phylloxera root resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **119**: 1039-1051.