

Daniel Zender  
Institut für Rebenzüchtung

Die *Erysiphe necator* Resistenzen  
*Ren3* und *Ren9* aus 'Regent' –  
Eingrenzung, Analyse von  
Kandidatengenomen und  
differentielle Genregulation



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt/Contact:  
Daniel Zendler  
Julius Kühn-Institut  
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen  
Institut für Rebenzüchtung  
Geilweilerhof  
76833 Siebeldingen

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind.

The publication series „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ publishes doctoral dissertations originating from research doctorates and completed at the Julius Kühn-Institut (JKI) either in close collaboration with universities or as an outstanding independent work in the JKI research fields.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot [www.julius-kuehn.de](http://www.julius-kuehn.de) Bereich Veröffentlichungen.

The monographs are distributed through the book trade (listed in German Books in Print - VLB) and OPEN ACCESS through the JKI website [www.julius-kuehn.de](http://www.julius-kuehn.de) (see Publications).

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.  
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.  
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:  
<http://www.julius-kuehn.de> Bereich Veröffentlichungen.

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.julius-kuehn.de> (see Publications).

### **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation  
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische  
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

### **Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek (German National Library)**

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.dnb.de>.

ISBN 978-3-95547-058-6  
DOI 10.5073/dissjki.2018.002

### **Herausgeber / Editor**

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland  
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany



Dieses Werk ist lizenziert unter einer [Creative Commons – Namensnennung – Weitergabe unter gleichen Bedingungen – 4.0 Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

This work is licensed under a [Creative Commons – Attribution – ShareAlike – 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

# Die *Erysiphe necator* Resistenzen *Ren3* und *Ren9* aus 'Regent' – Eingrenzung, Analyse von Kandidatengenomen und differentielle Genregulation

---

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. Nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte  
DISSERTATION

von  
M.Sc. Daniel Zendler

1. Referentin:	apl. Prof. Dr. Eva Zyprian
2. Referent:	Prof. Dr. Holger Puchta
Tag der mündlichen Prüfung:	05.02.2018

Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte am Julius Kühn Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof in Siebeldingen. Das Forschungsprojekt „Molekulare Charakterisierung des Resistenzlokus *Ren3*“ wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziell gefördert.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in der Fachzeitschrift *Euphytica* unter dem Titel „Fine mapping of *Ren3* reveals two loci mediating hypersensitive response against *Erysiphe necator* in grapevine“ sowie dem Deutschen Weinbau Jahrbuch 2016 unter dem Titel „Der Resistenzlokus *Ren3* aus 'Regent' – Eine Resistenzquelle gegen den Echten Mehltau“ veröffentlicht.



Gefördert durch  
**DFG** Deutsche  
Forschungsgemeinschaft

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungen.....	V
Tabellen.....	XII
Abkürzungen .....	XIV
Zusammenfassung.....	XVI
Abstract .....	XVII
<b>I Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1 Die Weinrebe <i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>vinifera</i> .....</b>	<b>1</b>
<b>I.2 Die wichtigsten Pathogene der Weinrebe .....</b>	<b>2</b>
<b>I.3 Resistenzzüchtung bei der Weinrebe .....</b>	<b>3</b>
I.3.1 „Marker Assisted Selection“ (MAS).....	4
I.3.2 Pyramidisierung von Resistenzen.....	5
I.4 Lebenszyklus von <i>E. necator</i> .....	5
I.5 Bekannte Resistenzen der Weinrebe gegen den Echten Mehltau.....	7
<b>I.6 Zielsetzung.....</b>	<b>8</b>
<b>II Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
<b>II.1.1 Material.....</b>	<b>10</b>
II.1.1.1 Geräte .....	10
II.1.1.2 Software und Datenbanken .....	11
II.1.1.3 Bakterienstämme.....	11
II.1.1.4 Vektoren.....	12
II.1.1.5 Kits.....	12
II.1.1.6 Puffer, Medien und Lösungen.....	12
<b>II.1.2 Pflanzenmaterial und <i>E. necator</i> Sporen.....</b>	<b>13</b>
II.1.2.1 Freiland Pflanzen .....	13
II.1.2.2 Stecklinge.....	13
II.1.2.3 <i>In vitro</i> Pflanzen.....	14
II.1.2.4 <i>Erysiphe necator</i> Sporenmaterial.....	14
<b>II.2 Methoden.....</b>	<b>14</b>
<b>II.2.1 Resistenzbonitur .....</b>	<b>14</b>
II.2.1.1 Freiland .....	14
II.2.1.2 „Detached leaf assay“ .....	15
<b>II.2.2 Färbemethoden.....</b>	<b>15</b>
II.2.2.1 Trypanblau-Färbung.....	15

II.2.2.2 Calcofluor White Färbung .....	15
<b>II.2.3 DNA Extraktion.....</b>	<b>16</b>
II.2.3.1 Einzelaufreinigung .....	16
II.2.3.2 96 Well Extraktion .....	16
<b>II.2.4 Erstellung von Oligonukleotiden für PCR Reaktionen .....</b>	<b>16</b>
<b>II.2.5 Design von genetischen Markern.....</b>	<b>17</b>
II.2.5.1 SSR-Marker .....	17
II.2.5.2 InDel-Marker .....	17
<b>II.2.5 PCR.....</b>	<b>17</b>
II.2.5.1 Kapa HiFi Hot-start.....	17
II.2.5.2 Phusion HiFi .....	18
II.2.5.3 Kapa2G Multiplex Mix .....	18
<b>II.2.6 Fragmentlängenanalyse .....</b>	<b>18</b>
II.2.6.1 Gelelektrophorese .....	18
II.2.6.2 Kapillarsequenzierer .....	19
<b>II.2.7 Erstellen von genetischen Karten .....</b>	<b>19</b>
<b>II.2.8 QTL-Analyse.....</b>	<b>20</b>
<b>II.2.9 Statistische Analysen.....</b>	<b>20</b>
II.2.9.1 Paardifferenztest.....	20
<b>II.2.10 Klonierung von PCR-Fragmenten.....</b>	<b>20</b>
II.2.10.1 Klonieren von PCR-Fragmenten zum Sequenzieren .....	20
II.2.10.2 Klonieren von <i>GFP</i> in pLH9070.....	23
II.2.10.4 Klonieren von R Genen aus <i>Ren3</i> für die Transformation in anfällige Rebsorten.....	25
II.2.10.5 Triparentales Mating für die Transformation von <i>A. tumefaciens</i> .....	27
<b>II.2.11 RNA Extraktion.....</b>	<b>28</b>
<b>II.2.12 Entfernen der Cap Struktur von mRNAs.....</b>	<b>29</b>
II.2.12.1 Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) .....	29
II.2.12.2 RNA 5'-Pyrophosphohydrolase (RppH).....	29
<b>II.2.13 RNA Ligation.....</b>	<b>30</b>
<b>II.2.14 cDNA Synthese .....</b>	<b>30</b>
II.2.14.1 cDNA Synthese für RT-PCR .....	30
II.2.14.2 cDNA Synthese für RT-qPCR .....	30
II.2.14.3 cDNA Synthese für CR-RT-PCR und 5'RACE.....	31
II.2.14.4 cDNA Synthese für 3'RACE .....	31
<b>II.2.15 RT-qPCR mit Power SYBR® Green und 7500 Fast Applied Biosystems.....</b>	<b>31</b>
<b>II.2.16 Analyse von Transkriptenden.....</b>	<b>32</b>
II.2.16.1 Large Gap Read Mapping und Transcript Discovery .....	32

II.2.16.2 5'RACE.....	33
II.2.16.3 3'RACE.....	34
II.2.16.4 CR-RT-PCR.....	34
<b>II.2.17 amiRNA für Kandidatengen Knock-down .....</b>	<b>35</b>
II.2.17.1 Erstellung von Artificial miRNAs .....	35
II.2.17.2 Amplifikation und Klonierung der erstellten amiRNAs .....	36
<b>II.2.18 Transformation von embryogenen Zellkulturgewebe .....</b>	<b>38</b>
II.2.18.1 Selektion von transgenen in vitro Pflanzen.....	38
<b>III Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
<b>III.1 Feinkartierung der Resistenzloci <i>Ren3</i> und <i>Ren9</i> in experimentellen</b>	
<b>Kreuzungspopulationen .....</b>	<b>40</b>
III.1.1 Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' .....	41
III.1.2 Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' .....	46
<b>III.2 Eingrenzung des Resistenzlokus <i>Ren9</i> durch Analyse von rekombinanten F1-Individuen</b>	
<b>aus weiteren experimentellen Kreuzungen .....</b>	<b>52</b>
<b>III.3 Kandidatengene für Resistenz gegen <i>E. necator</i> aus dem Resistenzlokus <i>Ren3</i>.....</b>	<b>55</b>
III.3.1 Transkriptanalyse der <i>Ren3</i> Kandidatengene.....	61
III.3.1.1 LGRM und Transcript discovery für <i>Ren3</i> Kandidatengene .....	61
III.3.1.2 Analyse von <i>Ren3-1</i> aus 'Regent' .....	64
III.3.1.2.1 3' RACE von <i>Ren3-1</i> .....	64
III.3.1.2.2 5' RACE von <i>Ren3-1</i> .....	66
III.3.1.2.3 RT-PCR von <i>Ren3-1</i> .....	68
III.3.1.2.4 CR-RT-PCR von <i>Ren3-1</i> .....	69
III.3.1.2.5 Funktionelle Domänen der beiden <i>Ren3-1</i> Transkripte .....	71
<b>III.4 Funktionelle Analyse von <i>Ren3-1</i> .....</b>	<b>72</b>
III.4.1 Knock-down von <i>Ren3-1</i> aus <i>Ren3</i> in 'Regent' .....	72
III.4.2 Transformation von anfälligen Rebsorten mit <i>Ren3-1</i> .....	77
<b>III.5 Gexpression von Resistenzassoziierten Genen .....</b>	<b>81</b>
III.5.1 RT-qPCR zum Nachweis der Transkription der Kandidatengene aus <i>Ren3</i> .....	82
III.5.2 Differentielle Regulation von bekannten Genen stromabwärts von NBS-LRR Genen.....	83
III.5.3 Differentielle Regulation von <i>VvNPR1</i> und bekannten <i>PR</i> -Genen der Weinrebe .....	85
III.5.4 Differentielle Regulation von bekannten Regulatoren der Hypersensitiven Reaktion .....	88
<b>IV Diskussion .....</b>	<b>93</b>
<b>IV.1 Feinkartierung der Resistenzloci <i>Ren3</i> und <i>Ren9</i> gegen den Echten Mehltau der Weinrebe</b>	
<b>in experimentellen Kreuzungspopulationen .....</b>	<b>93</b>

IV.1.1 Erstellung von genetischen Karten in den untersuchten experimentellen Kreuzungspopulationen .....	94
IV.1.2 Auswertung der erhobenen Resistenzbonituren der experimentellen Kreuzungspopulationen .....	96
IV.1.3 QTL-Analyse für die Resistenz gegen den Echten Mehltau in den experimentellen Kreuzungspopulationen .....	97
IV.1.4 Eingrenzung des Resistenzlokus <i>Ren9</i> durch rekombinante F1-Individuen aus unterschiedlichen experimentellen Kreuzungspopulationen .....	99
<b>IV.2 Identifikation von Resistenzgenanaloga im eingegrenzten QTL-Bereich von <i>Ren3</i> .....</b>	<b>101</b>
IV.2.1 Transkript Analyse von R-Genen aus <i>Ren3</i> .....	105
IV.2.2 Funktionelle Analyse von <i>Ren3-1</i> aus <i>Ren3</i> .....	107
<b>IV.3 Differentielle Genregulation nach Inokulation mit <i>E. necator</i> .....</b>	<b>108</b>
IV.3.1 R-Gene des Resistenzlokus <i>Ren3</i> .....	109
IV.3.2 Signaltransduktion nach Pathogen Rezeption durch R-Gene .....	111
IV.3.3 Differentielle Regulierung von bekannten <i>PR</i> -Genen der Weinrebe .....	113
IV.3.4 Differentielle Regulation von bekannten Regulatoren der „Hypersensitiven Reaktion“ .....	114
<b>IV.4 Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>117</b>
<b>Literatur .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>XXVI</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>XXXII</b>



## Abbildungen

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>E. necator</i> (Wilcox <i>et al.</i> , 2015).....	<b>6</b>
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung des pJET1.2/Blunt Plasmids ohne Insert. Blau markierte Abschnitte beziehen sich auf Gene mit offenem Leseraster. Der Replikationsursprung (ORI) wurde grün eingezeichnet. Gängige Restriktionsendonukleasen der MCS sind als Flaggen eingezeichnet. (pMB1 = Origin of Replikation (high copy), beta Lactamase = Ampicilin Resistenz, <i>Eco47IR</i> = Restriktionsendonuklease).....	<b>22</b>
<b>Abbildung 3:</b> <b>A</b> Schematische Darstellung von pLH9070 <i>GFP</i> mit der <i>GFP</i> Kassette. <b>B</b> Gelelektrophorese der PCR zur Bestimmung der Orientierung der <i>GFP</i> Kassette in pLH9070 <i>GFP</i> . Die PCR wurde mit GFP for und RB rev als Oligonukleotide durchgeführt. ....	<b>25</b>
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung des Inserts und des linearisierten Vektors, welche für die In-Fusion Klonierung verwendet wurden. ( <i>aadA</i> = Gen für Spectinomycin Resistenz, <i>nptII</i> = Gen für Kanamycin Resistenz, <i>bar</i> = Gen für Phosphinothricin Resistenz, LB = Left Boarder, RB = Right Boarder, ColE1 = Origin of Replication <i>E. coli</i> , parB ORI parA = Origin of Replication <i>A. tumefaciens</i> , P = nativer Promotor, T = nativer Terminator, GOI = Gene of Interest) .....	<b>27</b>
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung des triparentalen Matings mit <i>A. tumefaciens</i> EHA101/105, <i>E. coli</i> HB101 pRK2013 und <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pLH9070+Insert. ....	<b>28</b>
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung des LGRM und der Transcript Discovery (TD) mit RNAseq Daten zur Vorhersage von möglichen Splice Varianten. ....	<b>33</b>
<b>Abbildung 7:</b> Schema für die 5' RACE zur Analyse von 5'-Enden von Kandidatengenen. (Coding Sequence (CDS) des Kandidatengentranskriptes (gelb); 18S rRNA (orange); "Random Hexamer" Oligonukleotide (rhx); Amplifikationsoligonukleotide für RT-PCR und „nested“ RT-PCR (AC, AB)).....	<b>34</b>
<b>Abbildung 8:</b> Schema für die 3' RACE zur Analyse von 3'-Enden von Kandidatengenen. ((Coding Sequence (CDS) des Kandidatengentranskriptes (gelb); Oligonukleotid für die cDNA Synthese (3'RACE); Amplifikationsoligonukleotid für RT-PCR und „nested“ RT-PCR (AB, AC))......	<b>34</b>
<b>Abbildung 9:</b> Schematische Darstellung der durchgeführten CR-RT-PCR zur simultanen Analyse von 5' und 3'-Enden von RNAs. (UTR = untranslated region, CDS = coding sequence, RHX = „Random Hexamer“ Oligonukleotide).....	<b>35</b>
<b>Abbildung 10:</b> Schematische Darstellung zur Generierung von amiRNAs (Protokoll Rebecca Schwab, MPI for Developmental Biology, Tübingen 2005) .....	<b>37</b>
<b>Abbildung 11:</b> Ausschnitt des Stammbaums von 'Regent', 'Villard Blanc' und GF.GA-47-42 (Röckel, Maul, Hausmann, unveröffentlicht). Durch Literatur beschriebene Verwandtschaften wurden mit gestrichelten Linien dargestellt. Für Verwandtschaften, welche abgesichert sind durch SSR-Marker, wurde eine durchgängige Linie verwendet. Individuen mit <i>Ren9 Ren3</i> Allelen wurden grün markiert, anfällige rot und Akzessionen mit unbekanntem Genotyp wurde weiß hinterlegt. ....	<b>40</b>
<b>Abbildung 12:</b> Verteilung der vergebenen Boniturnoten zu den vier phänotypischen Evaluierungen der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' in der Vegetationsperiode 2016. Es wurden getrennt anfällige und resistente Genotypen pro Zeitpunkt aufgetragen. Signifikante Unterschiede sind im Graphen dargestellt (*** = $P \leq 0.001$ , ** = $P \leq 0.01$ , * = $P \leq 0.05$ , NS = nicht signifikant $P > 0.05$ ). .....	<b>42</b>

- Abbildung 13:** Genetische Karten von Chromosom 15 von 'Regent', 'Cabernet Sauvignon' und die integrierte genetische Karte 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' (Zendler *et al.*, 2017). Identische Marker wurden jeweils mit einer Linie miteinander verbunden. Markerabstände sind in Centimorgan [cM] angegeben.... **43**
- Abbildung 14:** QTL-Analyse für Resistenz gegen *E. necator* in der Vegetationsperiode 2016 in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon'. Links ist die genetische Karte von Chromosom 15 der 'Regent' Haplophase dargestellt. In die LOD Graphen wurde IM und MQM aufgetragen. Das Konfidenzintervall LOD±1 ist durch einen Kasten und LOD±2 durch Whisker links neben dem Graphen markiert. .... **45**
- Abbildung 15:** Verteilung der vergebenen Boniturnoten zu den fünf phänotypischen Evaluierungen der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' in den Vegetationsperioden 1999, 2000, 2003, 2005 und 2006. Es wurden getrennt anfällige und resistente F1-Individuen pro Bonitur aufgetragen. Signifikante Unterschiede sind im Graphen dargestellt (\*\*\*) =  $P \leq 0.001$ , \*\* =  $P \leq 0.01$ , \* =  $P \leq 0.05$ , NS = nicht signifikant  $P > 0.05$ ). .... **48**
- Abbildung 16:** Darstellung der berechneten integrierten genetischen Karte für Chromosom 15 der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc'. Markerpositionen sind in Centimorgan [cM] angeben..... **49**
- Abbildung 17:** Ergebnisse der QTL-Analysen der mit der neuen genetischen Karte und den Boniturdaten der Jahre 1999, 2000, 2003, 2005 und 2006. Ergebnisse des IM wurden jeweils in einer durchgezogenen schwarzen Linie angegeben. MQM Analysen sind in gestrichelten Linien angegeben. .... **50**
- Abbildung 18:** Boxplots der vergebenen Boniturnoten bei den untersuchten 35 rekombinanten Genotypen. Die Genotypen wurden nach Anwesenheit von *Ren9 Ren3*, *Ren3* beziehungsweise Abwesenheit dieser Allele gruppiert. Signifikante Unterschiede sind im Graphen dargestellt (\*\*\*) =  $P \leq 0.001$ , \*\* =  $P \leq 0.01$ , \* =  $P \leq 0.05$ , NS = nicht signifikant  $P > 0.05$ ). .... **52**
- Abbildung 19:** Dargestellt sind die berechnete genetische Karte von Chromosom 15 zusammen mit der durchgeführten Kruskal-Wallis (KW) und QTL-Analyse für Resistenz gegen *E. necator*. Das Intervall Mapping (IM) und das Multiple QTL Mapping (MQM) sind jeweils durch eine durchgezogene schwarze bzw. grüne gestrichelte Linie im Graphen dargestellt. Das Konfidenzintervall (LOD +/- 1, +/- 2) ist durch die Balken und die unterschiedlich signifikante Kopplung der jeweiligen genetischen Marker mit dem Merkmal Resistenz gegen *E. necator* ist durch die Anzahl der Sterne angegeben. .... **53**
- Abbildung 20:** Ergebnisse der beiden untersuchten rekombinanten F1-Individuen. Links neben den Bildern der Trypanblau-gefärbten Blätter ist schematisch dargestellt, wo sich der Punkt der Rekombination auf Chromosom 15 befindet. Der Punkt der Rekombination ist durch den Bruch zwischen roten und grünen Bereichen markiert. Für das Individuum 2015 097 0014 liegt die Rekombination zwischen Indel 7 und GF15 08 für 2015 097 0014 zwischen GF15 10 und Indel 7. (HR = Hypersensitive Reaktion, ap = Appressorium, hy = Hyphe, gs = gekeimte Spore). .... **54**
- Abbildung 21:** Schematische Darstellung von Chromosom 15. Es wurde die Lage von genetischen Markern mit ihrer physikalischen Position anhand des Referenzgenoms PN40024 12Xv0 eingezeichnet. Zusätzlich wurden die Bereiche der identifizierten Resistenzloci *Ren3* (rot) (Zendler *et al.*, 2017) und *Ren9* (grün) markiert. .... **55**

- Abbildung 22:** Schematische Darstellung des BAC-Klons H25C10 aus der 'Regent' BAC Bank. Kodierte Kandidatengene wurden rot eingerahmt. Die Vorhersage der RNA (schwarz) und CDS (gelb) wurde mit FGENESH (Softberry) durchgeführt. Funktionelle Domänen (braun) wurden mit dem von NCBI bereitgestellten online Programm „conserved domain search“ vorhergesagt (Schneider und Zyprian, unveröffentlicht). ..... 55
- Abbildung 23:** Schematische Darstellung des BAC-Klons B18K14 aus der 'Regent' BAC Bank. Das kodierte Kandidatengen wurde rot eingerahmt. Die Vorhersage der RNA (schwarz) und CDS (gelb) wurde mit FGENESH (Softberry) durchgeführt. Funktionelle Domänen (braun) wurden mit dem von NCBI bereitgestellten online Programm „conserved domain search“ vorhergesagt (Schneider und Zyprian, unveröffentlicht). ..... 57
- Abbildung 24:** Phylogenetischer Stammbaum der beschriebenen RGAs aus den Loci *Ren1* (schwarz), *Run1/Rpv1* (grün), *Ren2* (gelb) und den vier Kandidatengenen aus *Ren3* (rot). Das Phylogramm wurde mit der CLC Genomics Workbench erstellt (Starting Tree Algorithm: UPGMA, Nucleotide substitution model: GTR, Include rate variation, Nr. of substitutions per rate: 4, Gamma dist. para.: 1, Bootstrap: 100). Das Alignment hierfür wurde mit webPRANK erstellt (Löytynoja & Goldman, 2010). Es wurden Knoten mit Bootstrap Werten größer als 70 angegeben. Die Symbole der Endpunkte zeigen an um welche Art von RGA es sich bei den Genen handelt. .... 60
- Abbildung 25:** Ergebnisse der Gelelektrophorese der PCR-Fragmente zur Amplifikation des genetischen Markers ScORA7\*. PCR Bedingungen und die verwendete Polymerase sind rechts neben dem 1 % Agarosegel angegeben. .... 62
- Abbildung 26:** Ergebnisse des LGRM mit angeschlossener TD für den BAC-Klon H25C10. RNAs und CDSs die durch FGENESH vorhergesagt wurden, sind in schwarz bzw. gelb dargestellt. Die Vorhersagen der TD sind in Türkis (RNA), hellblau (mRNA) und rot (CDS) dargestellt. .... 62
- Abbildung 27:** Ergebnisse des LGRM mit angeschlossener TD für den BAC-Klon B18K14. RNAs und CDSs die durch FGENESH vorhergesagt wurden, sind in schwarz bzw. gelb dargestellt. Die Vorhersagen der TD sind in Türkis (RNA), hellblau (mRNA) und rot (CDS) dargestellt. .... 63
- Abbildung 28:** **A** Schematische Darstellung der *Ren3-1* Transkriptvorhersage durch FGENESH und LGRM+TD. Die Vorhergesagte RNA (schwarz), mRNA (blau) und CDS (gelb) wurden eingezeichnet. Zusätzlich wurden noch die prozessierten mRNAs dargestellt, bei denen die Introns herausgesplitt sind und ein Poly Adenin Stretch am 3'-Ende angefügt ist. Die erwarteten RT-PCR-Fragmente der beiden unterschiedlichen Transkripte sind unterhalb durch schwarze Balken eingezeichnet. **B** Ergebnisse der 3' RACE mit den homozygoten F1-Individuen aus 'Regent' x 'Lemberger'. Für diese Reaktion wurde die Oligonukleotidkombination I (3'RACE) und II (ORF5\_seq5) gewählt deren Lage in **A** dargestellt ist. **C** Ergebnisse der „nested“ 3' RACE mit den Oligonukleotiden A (3'RACE) und C (ORF5\_seq6). Als Template wurde 1µl von der 1/50 verdünnten 3' RACE verwendet. Der Stern markiert die Bande, welche ausgeschnitten und für eine Sequenzierung kloniert wurde. .... 65
- Abbildung 29:** Schematische Darstellung der erhaltenen cDNA Sequenzen nach sequenzieren des klonierten „nested“ 3' RACE Fragments. Es wurden die vorhergesagten mRNAs (blau) und CDSs (gelb) eingezeichnet. Vorhergesagte Introns wurden nummeriert (FGENESH I und II; LGRM+TD I – IV). Die sequenzierten 3'-Enden wurden in Blau über den Transkriptvorhersagen dargestellt. .... 66

- Abbildung 30:** A Schematische Darstellung der *Ren3-1* Transkriptvorhersage durch FGENESH und LGRM+TD. Die vorhergesagte RNA (schwarz), mRNA (blau) und CDS (gelb) wurden eingezeichnet. Es wurden zudem die hybriden RNAs aus prozessierter mRNA (herausgespligte Introns, Poly(A) stretch) und der an das 5'-Ende ligierten 18S rRNA dargestellt. Die erwarteten RT-PCR-Fragmente der beiden unterschiedlichen Transkripte sind unterhalb durch schwarze Balken eingezeichnet. B Ergebnisse der 5' RACE mit den homozygoten F1-Individuen aus 'Regent' x 'Lemberger'. Für diese Reaktion wurde die Oligonukleotidkombination I (18S rRNA qPCR for) und II (RPP8 1 5') gewählt deren Lage in (A) dargestellt ist. C Ergebnisse der „nested“ 3' RACE mit den Oligonukleotiden I (18S rRNA qPCR for) und III (RPP8 1 qPCR rev). Als Template wurde 1µl von der 1/50 verdünnten 5' RACE verwendet. .... 67
- Abbildung 31:** Darstellung des sequenzierten 5'-Ende von *Ren3-1* durch 5' RACE. Das neue 5'-Ende ist in Lila eingezeichnet zusammen mit den Ergebnissen der 3' RACE (blau) und der FGENESH Vorhersage. .... 68
- Abbildung 32:** A Schematische Darstellung der 5' und 3' RACE Ergebnisse von *Ren3-1*. Zusätzlich wurden noch die Bindestellen der Oligonukleotide für die Amplifikation des Lückenschlusses mittels „nested“ RT-PCR eingezeichnet (schwarze Pfeile) B Ergebnisse der RT-PCR mit den Oligonukleotiden I (RPP8 1 qPCR for) und II (*Ren3-1\_7*) mit den cDNAs der homozygoten F1-Individuen aus 'Regent' x 'Lemberger' C Ergebnisse der „nested“ RT-PCR mit den Oligonukleotiden III (RPP8 RGA Reg 3 A) und IV (*Ren3-1\_9*)..... 68
- Abbildung 33:** Darstellung des sequenzierten RT-PCR-Fragments und des daraus resultierenden *Ren3-1* Transkriptes aus 'Regent' mit 5' / 3' UTR (blau), der CDS (gelb) und dem identifizierten Intron I (identisch mit LGRM+TD Intron II)..... 69
- Abbildung 34:** A Schematische Darstellung der *Ren3-1* Transkriptvorhersage durch FGENESH und LGRM+TD und der durchgeführten 5' , 3' RACE und RT-PCR. Die vorhergesagte RNA (schwarz), mRNA (blau), CDS (gelb) und der Poly(A) „stretch“ in den zirkularisierten mRNAs wurden eingezeichnet. Die erwarteten RT-PCR-Fragmente der unterschiedlichen Transkripte sind daneben durch schwarze Balken eingezeichnet. B Ergebnisse der CR-RT-PCR mit cDNA von 'Regent'. Für diese Reaktion wurde die Oligonukleotidkombination I (ORF5\_seq6) und II (*Ren3-1\_10*) gewählt deren Lage in (A) dargestellt ist. C Ergebnisse der „nested“ CR-RT-PCR mit den Oligonukleotiden I (ORF5\_seq6) und III (RPP8 1 qPCR rev). Als Template wurde 1 µl von der 1/50 verdünnten CR-RT-PCR verwendet. .... 70
- Abbildung 35:** Darstellung der fünf sequenzierten Klone mit den „nested“ CR-RT-PCR-Fragmenten projiziert auf das Transkript der 5' , 3' RACE+RT-PCR. Das resultierende Transkript der CR-RT-PCR ist unterhalb dargestellt. Es wurden jeweils die RNA (schwarz), die 5' und 3' UTR Bereiche (blau) und CDS (gelb) eingezeichnet. .... 71
- Abbildung 36:** Schematische Darstellung der beiden detektierten Transkripte von *Ren3-1* und die beiden kodierenden Bereiche ohne Introns. Die durch den Conserved Domain Search (NCBI) gefundenen funktionellen Domänen sind in dunkelblau oberhalb der beiden Transkripte und der kodierenden Bereiche dargestellt. Es wurden die mRNA (blau), die CDS (gelb) und die gefundenen Introns (schwarz) eingezeichnet. .... 72
- Abbildung 37:** Schematische Darstellung der beiden *Ren3-1* Transkripte aus 'Regent' mit 5' / 3' UTR (Türkis), funktionellen Domänen (dunkelblau), CDS (gelb) und den Bindestellen der generierten amiRNAs (rot, amiR *Ren3-1\_1/2*). Ein Sequenzalignment der revers komplementären amiRNAs mit der Sequenz von *Ren3-1*. SNPs zwischen amiRNA und *Ren3-1* wurden rot hinterlegt..... 73

- Abbildung 38:** Schematische Darstellung der durchgeführten Restriktion von pLH9070 35SGFP mit *SwaI* und *BamHI* zur Entfernung der *GFP* kodierenden Sequenz. Die Restriktion wurde mithilfe einer Gelelektrophorese kontrolliert. .... 73
- Abbildung 39:** Schematische Darstellung der Restriktion von pJET2.1 amiR *Ren3-1\_1/2* mit *EcoRV* und *BamHI*. Die Restriktion wurde im Anschluss mithilfe einer Gelelektrophorese kontrolliert. .... 74
- Abbildung 40:** Schematische Darstellung der Restriktion von pLH9070 35S amiR *Ren3-1\_1/2* mit *BglIII*. Es sind pro Konstrukt jeweils drei positive Klone in der Gelelektrophorese dargestellt. .... 75
- Abbildung 41:** Kontroll PCR der *A. tumefaciens* EHA101 und EHA105 Klone nach Transformation mit pLH9070 35S amiR *Ren3-1\_1/2*. Über der Gelelektrophorese sind schematisch die Bindestellen der verwendeten Oligonukleotide für die PCR Reaktion dargestellt. .... 75
- Abbildung 42:** **A** Regenerierte und teilweise vereinzelte Embryonen aus embryogenem Zellkulturgewebe von 'Regent' nach Transformation mit den beiden amiRNA Konstrukten amiR *Ren3-1\_1* und *\_2*. Es wurden jeweils die Agrobakterienstämme EHA101 und EHA105 für die Transformation verwendet. **B** Vereinzelte, regenerierte Pflanzen auf Doppelselektionsmedium mit 100 µg/ml Kanamycin und 7,5 µg/ml Phosphinothricin. (WPM = McCown Woody Plant Medium (Duchefa), MS233 = Murashige & Skoog Medium M0233 (Duchefa), Kan = Kanamycin, Carb = Carbenicilin, Ppt = Phosphinothricin) ..... 76
- Abbildung 43:** **A** Schematische Darstellung der In-Fusion Klonierung. Homologe Sequenzen des zu inserierenden PCR-Fragments zum Zielvektor sind grün hinterlegt. Die beiden nachgewiesenen Transkripte von *Ren3-1* sind mit RNA (schwarz), mRNA (Türkis) und kodierenden Bereichen (gelb) eingezeichnet. Vorhergesagte Promotorbereiche (grün) und Enhancer (gelb) sind als Pfeile vor den Transkripten angegeben. **B** Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation des genomischen Bereichs von *Ren3-1*. **C** Gelelektrophorese von pLH9070 35SGFP vor und nach Inkubation mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *EcoRI + HindIII*. .... 78
- Abbildung 44:** **A** Schematische Darstellung des pLH9070 *Ren3-1*['Regent' genomic] Plasmids. Die kodierenden Bereiche der auf dem Plasmid enthaltenen Gene sind in gelb eingezeichnet. Das *Ren3-1* Insert wurde in grau eingezeichnet. Zusätzlich sind die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *BglIII* eingezeichnet. Die erwarteten Fragmente durch die Restriktionsendonukleasen sind neben dem Plasmid angegeben. **B** Gelelektrophoresen vor und nach Inkubation des pLH9070 *Ren3-1*['Regent' genomic] Plasmids mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *BglIII*. **C** Gelelektrophorese des *Ren3-1*['Regent' genomic] PCR Produkt nach Inkubation mit *XbaI* und *BglIII*. .... 79
- Abbildung 45:** Bereits selektionierte Embryonen aus Zellkulturgewebe von 'Chardonnay' nach Transformation mit pLH9070 *Ren3-1*['Regent' genomic] mit den beiden Agrobakterienstämmen EHA101 und EHA105. (MS233 = Murashige & Skoog Medium M0233 (Duchefa), Kan = Kanamycin, Carb = Carbenicilin, Ppt = Phosphinothricin) ..... 80
- Abbildung 46:** Trypanblau-gefärbte Blätter von 'Regent' und 'Chardonnay' fünf Tage nach Inokulation mit *E. necator*. (Ap = Appressorium, Hy = Hyphe, GS = gekeimte Spore, HR = Hypersensitive Reaktion, KP = Konidophor) ..... 81
- Abbildung 47:** Ergebnisse der RT-qPCR für die Kandidatengene *Ren3-1*, *Ren3-4* und *Ren3-5*. Es ist die relative Expressionsänderung (Foldchange) 8, 24, und 48 Stunden nach Inokulation mit *E. necator* aufgetragen. Die angegebenen Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der technischen Wiederholungen. (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$  ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$  ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ ) ..... 82

**Abbildung 48:** Ergebnisse der RT-qPCR für das Gen *VvNDRI*. Es ist die relative Expressionsänderung (Foldchange) 8, 24, und 48 Stunden nach Inokulation mit *E. necator* aufgetragen. Die angegebenen Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der technischen Wiederholungen. (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$  ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$  ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ ) ..... 83

**Abbildung 49:** Ergebnisse der RT-qPCR für die Gene *VvEDSI*, *VvEDL1*, *VvEDL2* und *VvEDL5*. Es ist die relative Expressionsänderung (Foldchange) 8, 24, und 48 Stunden nach Inokulation mit *E. necator* aufgetragen. Die angegebenen Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der technischen Wiederholungen. (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$  ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$  ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ )..... 84

**Abbildung 50:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvNPR1* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$  ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$  ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ )..... 85

**Abbildung 51:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvPRI* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$  ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$  ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ )..... 86

**Abbildung 52:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvPR5* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$  ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$  ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ ). Für den Zeitpunkt Regent 24 und 48 hpi wurden nur 2 biologische Wiederholungen bedingt durch jeweils einen Ausfall für die Berechnung verwendet. .... 87

**Abbildung 53:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvPRI0* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$  ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$  ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ )..... 87

**Abbildung 54:** Vereinfachte Darstellung des LSD1 „deathsomes“ aus *A. thaliana* (Coll *et al.*, 2011). Zusätzlich zu den Genen aus *A. thaliana* wurden die Orthologe der Weinrebe angegeben. .... 88

**Abbildung 55:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvMCI*, *VvMC2* und *VvMC3* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$  ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$  ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ )..... 89

**Abbildung 56:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvLSD1* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$  ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$  ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ )..... 90

**Abbildung 57:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvLOLI* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$  ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$  ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ )..... 90

- Abbildung 58:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvbZIP9* und *VvbZIP21* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$ ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ )..... **91**
- Abbildung 59:** Alignment des sequenzierten Resistenzlokus *Ren3* aus 'Regent' mit dem identifizierten homologen Bereich aus dem Referenzgenom PN40024 12Xv0. Die Positionsangaben über dem Alignment sind relativ zu der Position im Referenzgenom. Für das Alignment wurde das Online Tool webPRANK mit den Standardeinstellungen verwendet (Löytynoja & Goldman, 2010). Es wurden vorhergesagte Gene (schwarz; FGENESH, VIT Annotation) und durch LTR Harvest vorhergesagte (Standardeinstellungen) LTR Retrotransposons (orange) eingezeichnet (Ellinghaus *et al.*, 2008). Zusätzlich wurde die prozentuale Übereinstimmung farbkodiert eingezeichnet: Rot = 100 %, lila = 50 % (SNP, Deletion, Insertion), blau = 0 % (keine Sequenzinformation). .....**110**
- Abbildung 60:** QTL-Analyse für Resistenz gegen *E. necator* in der Vegetationsperiode 2016 in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon'. Links ist die genetische Karte von Chromosom 15 der 'Cabernet Sauvignon' Haplophase dargestellt. In die LOD Graphen wurde IM und MQM aufgetragen. Das Konfidenzintervall  $LOD \pm 1$  ist durch einen Kasten und  $LOD \pm 2$  durch Whisker links neben dem Graphen markiert. ....**XXVI**
- Abbildung 61:** Übersicht der vorhergesagten und experimentell nachgewiesenen Transkripte von *Ren3-1* aus 'Regent'. Es wurde jeweils die mRNA (blau), die CDS (gelb) und die gefundenen Introns (schwarz) eingezeichnet. ....**XXVI**
- Abbildung 62:** End Sequenzierung der beiden pLH8970 *Ren3-1\_IF* #3 und #4 Klone. Es wurde die detektierte cDNA (lila), das Insert (orange) und das Amplifikation Oligonukleotid (rot) eingezeichnet. Zusätzlich wurde die Übereinstimmung (Conservation Barplot) und die Sequenzier „Trace Data“ angegeben. ..**XXVII**
- Abbildung 63:** Alignment des *Ren3-4* RT-qPCR Amplicon mit *Ren3-4* aus 'Regent' und den beiden gefundenen Homologen auf Chromosom 15 von PN40024 12Xv0. ....**XXVIII**
- Abbildung 64:** Sequenzalignment von *Ren3-4* aus 'Regent' und den beiden flankierenden RGAs aus PN40024 12Xv0. Annotierte Gene (dunkel blau) und funktionelle Domänen (hell blau) wurden eingezeichnet. Unter dem Alignment wurde die Übereinstimmung der Sequenzen in einem Balkendiagramm angegeben. **XXVIII**
- Abbildung 65:** Mögliche Entstehung von *Ren3* in 'Regent' und 'Spätburgunder' anhand der gefundenen NBS-LRR Gene und LTR Retrotransposons. ....**XXVIII**
- Abbildung 66:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvMC4*, *VvMC5* und *VvMC6* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$ ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ )..... **XXIX**
- Abbildung 67:** RT-qPCR Ergebnisse für die sechs untersuchten Metacaspasen von *V. vinifera*. Der angegebene Foldchange wurde mit der  $\Delta\Delta C_t$  berechnet. Der  $T0 \Delta\Delta C_t$  von 'Regent' wurde dabei relative zur Expression von 'Chardonnay' berechnet um Unterschiede in der basalen Expression zwischen den beiden Genotypen darstellen zu können. ....**XXIX**

## Tabellen

<b>Tabelle 1:</b> Die möglichen Segregationsmuster, welche in einer Kreuzungspopulation (CP, JoinMap 4.1) auftreten können und ihre Kodierung für die Verrechnung in JoinMap 4.1 (JoinMap 4.1 Manual, J.W. van Oijen 2006).....	19
<b>Tabelle 2:</b> Zusammensetzung des 20µl Ligationsansatz für die Ligation eines aufgereinigten PCR-Fragments in das Plasmid pJET1.2/Blunt.....	21
<b>Tabelle 3:</b> Ansatz der Restriktionsanalyse der präparierten Plasmide mit <i>BglIII</i> .....	23
<b>Tabelle 4:</b> Die Restriktionsansätze für pLH9070 und pGJ- <i>GFP</i> mit <i>HindIII</i> .....	23
<b>Tabelle 5:</b> Ansatz zum Dephosphorylieren der 5'-Enden von pLH9070 mit FastAP.....	24
<b>Tabelle 6:</b> Ansatz für die Ligation der <i>GFP</i> -Kassette in pLH9070.....	24
<b>Tabelle 7:</b> Reaktionsansatz zur Amplifikation der Kandidatengene aus dem Resistenzlokus <i>Ren3</i> .....	26
<b>Tabelle 8:</b> Verwendetes PCR Programm zur Amplifikation der Kandidatengene.....	26
<b>Tabelle 9:</b> Reaktionsansatz zum Entfernen der Cap-Struktur von mRNAs mithilfe des Enzyms TAP.....	29
<b>Tabelle 10:</b> Reaktionsansatz zum Entfernen der Cap-Struktur von mRNAs mithilfe des Enzyms RppH.....	30
<b>Tabelle 11:</b> Ansatz für die Ligation von RNA mithilfe der T4-RNA-Ligase.....	30
<b>Tabelle 12:</b> Ansatz für die cDNA Synthese für qPCR Analysen.....	31
<b>Tabelle 13:</b> Ansatz für die cDNA Synthese aus ligierter gesamt RNA.....	31
<b>Tabelle 14:</b> Ansatz und PCR Programm für qPCRs mit Power SYBR® Green auf dem 7500 Fast Applied Biosystems® System.....	32
<b>Tabelle 15:</b> Verteilung von <i>Ren3</i> , <i>Ren9</i> , <i>Ren9 Ren3</i> und anfällig in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' zusammen mit der medianen Boniturnote der einzelnen phänotypischen Evaluierungen im Jahr 2016.....	42
<b>Tabelle 16:</b> Ergebnisse der QTL-Analyse in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' für das Jahr 2016 mit der genetischen Karte von 'Regent'. Für die vier durchgeführten Bonituren sind die Ergebnisse des IM und MQM mit MapQTL 6.0 aufgelistet.....	45
<b>Tabelle 17:</b> Ergebnisse der QTL-Analyse in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' für das Jahr 2016 mit der genetischen Karte von 'Cabernet Sauvignon'. Für die vier durchgeführten Bonituren sind die Ergebnisse des IM und MQM mit MapQTL 6.0 aufgelistet.....	46
<b>Tabelle 18:</b> Übersicht der median Boniturnoten der Population und für Individuen jeweils mit Resistenz-assoziierten <i>Ren9/Ren3</i> -Allelen und ohne. Für die Auswertung wurden nur Individuen verwendet, für welche in allen fünf Jahren Resistenzbonituren durchgeführt wurden (n=134).....	47
<b>Tabelle 19:</b> Allel Größen in Basenpaaren der Ausgewerteten SSR-Marker in der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc'. Resistenz-assoziierte Allele sind kursiv geschrieben.....	48
<b>Tabelle 20:</b> Ergebnisse der QTL-Analysen mit der integrierten genetischen Karte von GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' und den Boniturdaten aus den Jahren 1999, 2000, 2003, 2005 und 2006. Es sind jeweils die Ergebnisse des IM und MQM angegeben.....	51
<b>Tabelle 21:</b> Ergebnisse von blast-x (besten drei Treffer) und „conserved domain search“ für die gefundenen Resistenzgene und die in den flankierenden Bereichen gefundenen Gene auf dem BAC-Klon H25C10. Durch FGENESH vorhergesagte Gene für diesen BAC-Klon wurden mit „HC“ am Ende markiert.....	56



**Tabelle 22:** Ergebnisse von blast-x (besten drei Treffer) und „conserved domain search“ für die gefundenen Resistenzgene und die in den flankierenden Bereichen gefundenen Gene auf dem BAC-Klon B18K14.  
Durch FGENESH vorhergesagte Gene für diesen BAC-Klon wurden mit „BK“ am Ende markiert..... **58**

**Tabelle 23:** Ergebnisse der „Transcript Discovery“ für den BAC-Klon H25C10..... **63**

**Tabelle 24:** Ergebnisse der „Transcript Discovery“ für den BAC-Klon B18K14..... **64**

**Tabelle 25:** Übersicht der identifizierten Introns mit ihrer vorhergesagten Länge von FGENESH und LGRM+TD..... **66**

**Tabelle 26:** Übersicht der identifizierten *EDSI* und *EDSI-like* Gene mit ihrer Position auf Chromosom 17 (Gao *et al.*, 2010)..... **84**

**Tabelle 27:** Übersicht über die *in silico* vorhergesagten und experimentell detektierten Transkripte für *Ren3-1*.  
..... **106**

**Tabelle 28:** Oligonukleotide welche für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet wurden.  
.....**XXX**

## Abkürzungen

3'RACE	3' rapid amplification of cDNA ends
5'RACE	5' rapid amplification of cDNA ends
amiRNA	artificial micro ribonucleic acid
ap	Appressorium
ASC	automatic co-factor selection
ATP	Adenosintriphosphat
Avr	Avirulenz
blast	basic local alignment search tool
BAC	bacterial artificial chromosome
<i>bar</i>	bialaphos resistance
Carb	Carbenicillin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CC	coiled-coil
cM	Centimorgan
CDS	conserved domain search
CP	crosspopulation
DAMP	damage associated microbial pattern
DICER	Endonuklease
DNA	deoxyribonucleic acid
DH	double haploid
<i>EDL</i>	<i>EDS1 like</i>
<i>EDS1</i>	<i>ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
ETI	effector triggered immunity
FC	fold change
GDC	glycin decarboxylase complex
<i>GFP</i>	grün fluoreszierendes Protein
Guardee	Pflanzeigenes, durch Resistenzgene überwachtetes Protein
gs	Gekeimte Spore
HR	Hypersensitive Reaktion
hy	Hyphe
IM	Interval Mapping
InDel	insertion/deletion marker
Kan	Kanamycin
LB	lysogeny broth
LG	linkage group
LGRM	large gap read mapping
LOD	logarithm of the odds
<i>LOL1</i>	<i>LSD1-Like 1</i>
<i>LSD1</i>	<i>LESION SIMULATING DISEASE RESISTANCE 1</i>
LRR	leucine rich repeat
LTR	long terminal repeat
MAMP	microbial associated molecular pattern
MAPK	mitogen activated protein kinase
MAS	marker assisted selection
<i>MC</i>	Metacaspase
MCS	multiple cloning site
ML	maximum likelihood
MTI	MAMP triggered immunity
MQM	multiple QTL mapping
NB-ARC	nucleotide binding site-APAF1, R-gene, CED4
NBS	nucleotide binding site

<i>NDR1</i>	<i>NON HOST DISEASE RESISTANCE 1</i>
NGS	next generation sequencing
<i>NPR1</i>	<i>NON EXPRESSOR OF PR 1</i>
OIV	Internationale Organisation für Reben und Wein
PCD	programmed cell death
PCR	polymerase chain reaction
PIWI	pilzwiderstandsfähig
Ppt	Phosphinothricin
<i>PR</i>	pathogenesis related
QTL	quantitative trait locus
R-Gen	Resistenzgen
RGA	Resistenzgenanaloga
RISC	RNA-induced silencing complex
RLK	receptor like kinase
RLP	receptor like protein
RNA	ribonucleic acid
RNAseq	RNA-Sequenzierung
RppH	RNA 5' Pyrophosphohydrolase
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
RT-qPCR	reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
SA	salicylic acid
SNP	single nucleotide polymorphism
SSR	simple sequence repeat
T-DNA	Transfer-DNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	tobacco acid pyrophosphatase
TD	transcript discovery
TIR	Toll/Interleukine receptor
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TSSP	transcription start site prediction
VAC DNA pol	Vaccinia Virus DNA Polymerase
WPM	woody plant media
WGS	whole genome shotgun sequencing
Y2H	yeast two hybrid

## Zusammenfassung

Durch die hier vorgestellten Arbeiten konnten in zwei unabhängigen experimentellen Kreuzungspopulationen die beiden beschriebenen Resistenzloci *Ren3* und *Ren9* gegen den Echten Mehltau der Weinrebe bestätigt werden. Der Resistenzloкус *Ren3* konnte in Parallelarbeiten auf ein 200 kb Intervall eingegrenzt werden und es konnte eine HR als Resistenz-Mechanismus gezeigt werden. In den beiden Kreuzungspopulationen 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' und GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' konnten die beiden Resistenzen durch QTL-Analysen mithilfe von Feldboniturdaten nachgewiesen werden. Der zuvor neu beschriebene Resistenzloкус *Ren9* konnte durch genetische und mikroskopische Analysen mit F1-Individuen aus unterschiedlichen experimentellen Kreuzungspopulationen auf ein Intervall von rund 300 kb eingegrenzt werden. Dabei wurden die genetischen Marker GF15-08, GF15-10 und Indel-7 als Resistenz-gekoppelte genetische Bereiche identifiziert. Ebenfalls zeigten diese Analysen eine HR ausgelöst durch die in *Ren9* kodierten Gene, nach Inokulation mit dem Echten Mehltau. Durch Parallelarbeit zur Eingrenzung des Resistenzloкус *Ren3*, war eine Analyse der dort kodierten Gene möglich. Diese Untersuchungen identifizierten ein Cluster aus vier CC-NBS-LRR Genen in diesem Resistenzloкус. Durch Transkript-Analysen konnten zwei unterschiedliche Splice-Varianten des Gens *Ren3-1* identifiziert werden. Analysen zur differentiellen Genregulation zeigten, dass die beiden identifizierten R-Gene *Ren3-1* und *Ren3-4* nur in 'Regent' transkribiert werden. Für *Ren3-4* konnte hierbei eine Induktion nach Inokulation mit dem Echten Mehltau festgestellt werden. Diese Induktion könnte darauf hindeuten, dass *Ren3-4* das Resistenz-vermittelnde Gen aus *Ren3* ist. Eine vergleichende Analyse des Resistenzloкус *Ren3* aus 'Regent' mit der Sequenz des Referenzgenoms PN40024 12Xv0 zeigte eine etwa 110 kb große Insertion im kodierenden Bereich von *Ren3-4*. In dieser Insertion wurden mehrere Retrotransposons identifiziert. Im Promotorbereich von *Ren3-1* konnte in PN40024 12Xv0 ein zusätzliches Retrotransposon identifiziert werden. Die 110 kb Insertion und das zusätzliche Retrotransposon führen wahrscheinlich dazu, dass die beiden Gene exklusiv in 'Regent' transkribiert werden. Da PN40024 einen reinen *V. vinifera* Hintergrund aufweist und diese Art der Weinrebe sich getrennt vom Echten Mehltau entwickelt hat, könnte die Insertion der Retrotransposons ein Hinweis für die Stilllegung von nicht benötigten Resistenzgenen sein. Dies ist ein wirkungsvoller Mechanismus, welcher möglichen Autoimmunreaktionen vorbeugen kann. Bei der Analyse der differentiellen Regulation von bekannten Resistenz-vermittelnden Genen

konnten nach Inokulation von 'Regent' im Vergleich zu der anfälligen Rebsorte 'Chardonnay' deutliche Unterschiede festgestellt werden. Insbesondere bei der Regulation der bekannten *PR*-Gene konnte gezeigt werden, dass die Resistenz-Antwort in 'Regent' schneller und andauernder ist. Bei der differentiellen Genregulations-Analyse konnten des weiteren, mögliche orthologe Gene der HR-Regulation, welche aus *A. thaliana* bekannt waren, in der Weinrebe untersucht werden. Eine beobachtete differentielle Regulation dieser Gene in 'Regent' verglichen mit 'Chardonnay' nach Inokulation mit dem Echten Mehltau, stellt den ersten Schritt dar, um auf molekularer Ebene die mikroskopisch beobachtete HR nachzuvollziehen. Es konnten ebenfalls Vorarbeiten für die funktionelle Analyse von *Ren3-1* eingeleitet werden durch die Erstellung von amiRNAs zum Knock-down in 'Regent' und Transformationen von anfälligen Reben mit *Ren3-1*.

## Abstract

The work presented here confirms the two recently described resistance loci *Ren3* and *Ren9*, which confer resistance to grapevine powdery mildew in two independent crosspopulations. The interval of *Ren3* could be delimited to a 200 kb region by parallel work. Further it could be shown that this locus enables the plant to react with a HR upon powdery mildew infection. It was possible to reproduce the two described resistance loci by QTL analysis with phenotypic field data in the two populations 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' and GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc'. Also it was shown that a classification into resistant and susceptible genotypes according to observed SSR marker alleles of the resistance-linked genetic markers was possible. By genotypic and microscopic analysis of specifically selected F1 individuals with recombination on chromosome 15 from different crosses, the genomic interval of the resistance locus *Ren9* was reduced to around 300 kb. The genetic markers GF15-08, GF15-10 and Indel-7 were identified to be closely linked to the locus conferring resistance to powdery mildew. Furthermore, HR associated with appressoria after infection with powdery mildew could be confirmed for *Ren9*. Parallel works on *Ren3* enabled an analysis of genes encoded in this resistance locus. Hereby a cluster of four CC-NBS-LRR genes was identified. Transcript analysis of *Ren3-1* revealed two different splice variants for this gene. Differential gene expression experiments after inoculation with powdery mildew showed that the two genes *Ren3-1* and *Ren3-4* are exclusively transcribed in the grapevine cultivar 'Regent' and that transcript levels of *Ren3-4* are elevated upon infection with powdery mildew. The elevated transcript levels of *Ren3-4* could give a hint that this gene might confer the resistance to

powdery mildew associated with the resistance locus *Ren3*. A comparison of *Ren3* from ‘Regent’ and the reference genome PN40024 12Xv0 revealed major differences. Here an approximately 110 kb insertion in the coding region of *Ren3-4* was identified comprising several retroelements. Also in the promoter region of *Ren3-1* an additional retroelement was identified in PN40024 12Xv0. These two insertions probably inactivate the resistance genes in the susceptible PN40024. Their absence explains the exclusive transcription of these two genes in ‘Regent’. PN40024 has a pure *V. vinifera* background. This grapevine species evolved without the presence of powdery mildew. The insertion of the found retroelements could therefore be a way to silence not needed resistance genes. This silencing mechanism is thought to help prevent autoimmunity conferred by resistance genes. Analysis of differential gene expression upon inoculation with powdery mildew revealed major differences between the resistant cultivar ‘Regent’ and the susceptible cultivar ‘Chardonnay’. Especially by looking at genes of the pathogenesis-related group it could be shown that the resistance response in ‘Regent’ is faster and longer lasting. Additionally, it was possible to analyze possible orthologous genes involved in HR regulation, which were already described in *A. thaliana*. The differential expression of these genes in ‘Regent’ compared to ‘Chardonnay’ after inoculation with powdery mildew, could indicate the first steps in characterizing the observed HR on a molecular level. Furthermore, it was possible to prepare for the functional analysis of *Ren3-1* by generating amiRNA constructs and transforming them into ‘Regent’ for a knockdown of the gene. In addition, it was possible to transform susceptible genotypes with the gene *Ren3-1*.

## I Einleitung

### I.1 Die Weinrebe *Vitis vinifera* ssp. *vinifera*

Wein ist neben Bier eines der ältesten alkoholischen Genussmittel, welches durch Vergärung seiner Ausgangsmaterialien hergestellt wird. Der Anbau von Weinreben reicht wahrscheinlich mehr als 7000 Jahre zurück, als die ersten Siedlungen durch Menschen erschaffen wurden. Der Ursprung der uns heute bekannten domestizierten Weinrebe *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* liegt vermutlich im Südkaukasus, zwischen dem Kaspischen und Schwarzen Meer. Dort entstand sie aus *V. vinifera* ssp. *sylvestris*, einer zweihäusigen Wildrebenart. Folgen der Domestikation von *V. vinifera* ssp. *vinifera* waren größere Beeren, ein höherer Zuckergehalt dieser und der Geschlechtswandel von zweihäusig zu hermaphrodit (Myles *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2017). Der erste Anbau von Weinreben in der deutschen bzw. französischen Region Europas dürfte vor etwa 2800 Jahren stattgefunden haben. Durch die Kultivierung über einen solch langen Zeitraum konnte die Qualität der europäischen Weinrebe im Gegensatz zu ihren verwandten eurasischen Wildarten *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* und *caucasica* um ein Vielfaches gesteigert werden. Dies wird durch den Umstand deutlich, dass der genetische Hintergrund von fast allen heute angebauten Kulturweinreben auf den von *V. vinifera* ssp. *vinifera* zurückzuführen ist (This *et al.*, 2006). Betrachtet man die jährliche Produktion von Wein, Tafeltrauben und Rosinen, so wird deutlich, dass die Rebe eine überaus ökonomisch wichtige Kulturpflanze darstellt. Im Jahr 2014 beispielsweise lag die geschätzte weltweite Produktion von Wein bei etwa 269 Mio. hl, die von Tafeltrauben bei etwa 26,7 Mt und die von Rosinen bei etwa 1,54 Mt. Die weltweite Anbaufläche von Kulturreben erstreckt sich auf etwa 7,54 Mio. ha Land was in etwa  $\frac{1}{4}$  der gesamten Fläche von Deutschland entspricht ([www.oiv.int](http://www.oiv.int)).

Neben *V. vinifera* haben sich im asiatischen und nordamerikanischen Raum weitere Wildrebenarten entwickelt. Die wichtigsten Vertreter des amerikanischen Raumes wären hier *Muscadinia rotundifolia*, *Vitis rupestris*, *Vitis riparia*, *Vitis cinerea*, *Vitis labrusca* und *Vitis aestivalis*. Im asiatischen Raum wären hier Arten wie *Vitis amurensis*, *Vitis romanetii*, *Vitis davidii* and *Vitis piasezkii* zu nennen. Diese Wildrebenarten stellen durch ihre enge Verwandtschaft und ihrer Kreuzbarkeit mit *V. vinifera* wichtige genetische Ressourcen dar.

## I.2 Die wichtigsten Pathogene der Weinrebe

Mitte des 19. Jahrhunderts wurden gleich mehrere Weinreben Pathogene aus Nordamerika nach Europa eingeschleppt bedingt durch den Handel von England und Frankreich mit der USA. Bei den Pathogenen handelte es sich um die Reblaus (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch), den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola* (Berk. & Curt) Berl. & de Toni) und den Echten Mehltau (*Erysiphe necator* (Schwein.) Burr., syn. *Uncinula necator*, anamorph *Oidium tuckeri* Berk.), welche kombiniert katastrophale Konsequenzen für den europäischen Weinbau zur Folge hatten (Wilcox *et al.*, 2015). Da *V. vinifera* ssp. *vinifera* (ab hier *V. vinifera*) sich isoliert von diesen Pathogenen entwickelt hat, besaßen die bis dahin gezüchteten Kulturreben keine natürliche Resistenzen gegen die drei neu eingeführten nordamerikanischen Pathogene. Der Pilz *E. necator*, war das Erste der drei Pathogene, welches seinen Weg nach Europa machte und etwa 1847 zum ersten Mal in England auf Gewächshausreben beschrieben wurde. Er führte in den folgenden Jahren, nach seiner Ausbreitung in Europa, zu Ernteaussfällen von teilweise bis zu 100 % (Berkeley, 1847; Wilcox *et al.*, 2015). Betrachtet man die Erstbeschreibung, so kommt die Vermutung auf, dass zu diesem Zeitpunkt ebenfalls der Falsche Mehltau beschrieben wurde:

„The tissue of the leaves is traversed by a branched mycelium, which at last makes its way through the stomata, [...] The mildew is not confined to the lower surface of the leaves, though it is most frequent there, in consequence of [...] more frequent stomata there.“ (Berkeley, 1847)

Der erste Satz beschreibt das verzweigte Wachstum von *E. necator* auf der Oberfläche von Blättern, aber gleichzeitig auch ein Wachstum aus den Stomata der Blätter, was exklusiv bei *P. viticola* auftritt. Ebenso wird im zweiten Satz die Verteilung des Wachstums auf Unter- und Oberseite des Blattes beschrieben mit einem stärkeren Wachstum auf der Unterseite der Blätter. Dies spricht ebenfalls für den Falschen Mehltau, welcher bedingt durch sein Wachstum aus den Stomata, auf die Unterseite der Blätter beschränkt ist (Armijo *et al.*, 2016; Wilcox *et al.*, 2015). Der Oomycet, *P. viticola* und seine verursachten Krankheitssymptome, wurden jedoch erst rund 30 Jahre später in der Region von Bordeaux beschrieben (Wilcox *et al.*, 2015).

Neben diesen beiden Pathogenen, wurde die Reblaus nach Europa eingeschleppt. Dieses Insekt befällt nicht nur Blätter, sondern auch die Wurzel der Rebe, an der sie auch den



größten Schaden verursacht. Der Befall führt zur Gallenbildung an jungen und alten Wurzeln, wodurch deren Wasser- und Nährstoffaufnahme eingeschränkt wird. Die Infektionsstellen der Reblaus bilden zusätzlich Eintrittsstellen für andere pathogene Pilze und Bakterien (Wilcox *et al.*, 2015). Das Reblausproblem konnte mittlerweile, durch die Verwendung von Reblaus-resistenten bzw –toleranten Unterlagen, gelöst werden, wodurch sie heute kein größeres Problem im Weinbau darstellt. Dabei wird einjähriges Holz von der Kulturweinrebe, in einem Prozess der „Rebveredelung“ genannt wird, auf eine resistente Rebsorte gepfropft. Bei diesen resistenten Rebsorten handelt es sich meistens um Akzessionen von nordamerikanischen Wildrebenarten wie z.B. *V. berlandieri*, *V. riparia* oder *V. rupestris* (Campell, 2004) oder Kreuzungen davon mit *V. vinifera*.

Die beiden anderen obligat biotrophen Parasiten, der Flasche und Echte Mehltau hingegen, sind heute wie damals noch immer für erhebliche Ernteauffälle verantwortlich, falls Wetterbedingungen deren Entwicklung begünstigen. Heutzutage sind diese beiden Pathogene weltweit in nahezu jedem Weinanbaugebiet vorzufinden und ein erheblicher Aufwand muss betrieben werden, um ihnen entgegenzuwirken.

Neben diesen drei Pathogenen sind noch die Schwarzfäule und Graufäule als wichtige Pilzkrankheiten im Weinbau zu nennen. Die beiden Krankheiten werden durch die hemibiotrophen Pathogene *Guignardia bidwellii* bzw. *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*) verursacht.

### **I.3 Resistenzzüchtung bei der Weinrebe**

Wie bereits erwähnt, besitzen alle heute angebauten Kulturreben, für Wein-, Tafeltrauben- oder Rosinenproduktion, den genetischen Hintergrund von *V. vinifera* (This *et al.*, 2006). Da *V. vinifera*, durch die räumliche Trennung von Nordamerika, wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, erst vor etwa 150 Jahren mit den beiden Pathogenen *E. necator* und *P. viticola* in Kontakt gekommen ist, waren hier im Gegensatz zu den nordamerikanischen Wildrebenarten, keine natürlichen Resistenzen bei den europäischen Kulturreben vorhanden. *V. vinifera* stellt somit eine hoch anfällige Rebenart dar, deren Anbau heutzutage eines enormen Pflanzenschutzes bedarf. Betrachtet man die statistischen Zahlen zum Verbrauch von Pflanzenschutzmitteln so wird deutlich, dass die Kultivierung von Reben mit Abstand die größte Menge an Fungiziden jährlich verschlingt. Am Beispiel der EU lässt sich dies anschaulich darstellen. Die Anbaufläche für Reben macht etwa 3,4 % der gesamten landwirtschaftlich genutzten Fläche in der EU aus, jedoch werden jährlich rund 68.773 t Fungizide auf diese Fläche ausgebracht. Dies entspricht ca. 66 % der gesamten, jährlich

verwendeten Menge an Fungiziden, in der EU (European Commission, 2007). Dies bedeutet einen hohen Zeitaufwand und hohe finanzielle Belastungen für die Landwirte sowie eine hohe Belastung der Umwelt und des Grundwassers durch die enorme Menge an ausgebrachten Fungiziden (Komárek *et al.*, 2010).

Eine Möglichkeit, um diese Probleme anzugehen, stellt die Züchtung neuer pilzwiderstandsfähiger Rebsorten (PIWIs) dar. Wie oben erwähnt, wurden die Mehltau-Erreger, die diese enormen Probleme verursachen, aus Nordamerika nach Europa eingeschleppt. Die in Nordamerika beheimateten Wildrebenarten durchliefen eine Co-Evolution mit den beiden Mehltauerregern. Daraus resultieren natürliche genetische Resistenzen gegen diese Pathogene. Daneben wurden auch bei asiatischen Wildreben mittlerweile Resistenzen gegen die beiden Mehltau-Erreger beschrieben, obwohl diese nicht endemisch für diesen Raum sind (Alleweldt & Possingham, 1988; Eibach *et al.*, 2010). Zu Beginn der Resistenzzüchtung im 19. Jhd. wurden resistente Wildreben mit Kulturreben gekreuzt. Hierbei zeigte sich jedoch, dass durch die Wildreben nicht nur die Resistenzeigenschaft, sondern auch negative Aspekte wie Fehlgerüche, schlechter Wuchs und kleine Trauben eingekreuzt wurden. Es war also nötig, nach der Introgression der Resistenz einige Rückkreuzungen mit hochqualitativen Kulturreben durchzuführen. Diese Anfänge der Resistenzzüchtung spiegeln sich in den amerikanischen bzw. französischen Hybriden wieder, welche jedoch noch keine gute Weinqualität aufwiesen (Töpfer *et al.*, 2011).

### **I.3.1 „Marker Assisted Selection“ (MAS)**

Die Resistenzzüchtung bei der Weinrebe wurde nachhaltig verändert, als genetische Marker zur gezielten Selektion nutzbar wurden (Töpfer *et al.*, 2011). Genetische Marker beziehen sich auf spezielle Sequenzmuster an spezifischen Stellen in der genomischen DNA, welche es erlauben, Bereiche im Genom mit phänotypischen Merkmalen zu verknüpfen.

Durch die Erstellung von Kreuzungspopulationen aus resistenten Wildreben und anfälligen Kulturreben mit den dazugehörigen genetischen Karten und anschließender QTL (Quantitative Trait Locus)-Analyse konnten mittlerweile etliche genomische Bereiche in den unterschiedlichen Wildreben mit Resistenz gegen die beiden Mehltau Erreger assoziiert werden ([www.vivc.de](http://www.vivc.de)). Die dabei entwickelten genetischen Marker, welche eng gekoppelt sind mit den gewünschten Resistenzen, können für die „marker assisted selection“ (MAS) verwendet werden. Dadurch ist es möglich, bereits im Sämlings-Stadium auf genetischer Ebene zu bestimmen, ob ein Sämling aus einer Kreuzung eine Resistenz gegen das gewünschte Pathogen trägt oder nicht.

Die MAS stellt, vor allem bei mehrjährigen Pflanzen wie der Weinrebe, ein wichtiges Werkzeug dar, da hier bis zur ersten Qualitätsprüfung der Neuzüchtung bis zu acht Jahre vergehen können. Eine MAS von guter Weinqualität, mit genetischen Markern, die wichtige Eigenschaften wie Säure- bzw. Zuckerproduktion und die Zusammenstellung von wichtigen Aromakomponenten schon im Sämlings-Stadium identifizieren könnte, würde neben der Detektion von Resistenzen zu einer wesentlichen Beschleunigung des Zuchtvorgangs beitragen.

### **I.3.2 Pyramidisierung von Resistenzen**

Ein weiteres Ziel der Züchtung von neuen Rebsorten stellt die Pyramidisierung von Resistenzen dar. Hierbei werden mehrere Resistenzen gegen jeweils ein Pathogen in einer Rebsorte vereint, um eine möglichst dauerhafte Resistenz zu generieren. Da es mittlerweile bereits Berichte gibt, dass manche der bekannten Resistenzloci durch manche Pathogenstämme überwunden werden konnten, stellt die Pyramidisierung von Resistenzen ein wichtiges Zuchtziel dar (Cadle Davidson *et al.*, 2011; Peressotti *et al.*, 2010). Vor allem bei einer Kulturpflanze wie der Weinrebe, welche in einer extremen Monokultur angebaut wird und zusätzlich teilweise bis zu 30 Jahre im Weinberg verbleibt, sind dauerhafte Resistenzen ein wichtiges Kriterium (Agurto *et al.*, 2017; Eibach *et al.*, 2007).

Ein wichtiges Kriterium zur effizienten Pyramidisierung von Resistenzen stellt die Charakterisierung der einzelnen Resistenzen dar. Eine Kombination aus möglichst unterschiedlichen Resistenzmechanismen ist hierbei wünschenswert. Hierfür ist es unabdingbar, den genauen Wirkmechanismus der zu kombinierenden Resistenzen zu ermitteln. Um dies zu bewerkstelligen, müssen z.B. artifizielle Inokulationen mit anschließenden mikroskopischen Studien durchgeführt werden. Des Weiteren sollte nach Möglichkeit geklärt werden, welche Gene für die Resistenzvermittlung zuständig sind. Bei den bis dato bekannten Resistenzen der Wildreben handelt es sich um spezifische Resistenzen, die zusätzlich zur basalen Immunität der Pflanze entstanden sind, bedingt durch ihre Co-Evolution mit dem Pathogen.

### **I.4 Lebenszyklus von *E. necator***

Der obligat biotrophe Pilz *E. necator* besitzt einen zweigeteilten Lebenszyklus, welcher sich in einen generativen und einen vegetativen Abschnitt einteilen lässt. Der vegetative Zyklus beginnt im Frühjahr. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass Konidiosporen über den Winter in dormanten Knospen verbleiben und nach dem Austrieb der Knospe keimen und zu einer starken Infektion des neuen Triebes führen. Solche stark befallenen Triebe werden

„Zeigertriebe“ genannt. Die zweite Möglichkeit für den Start der vegetativen Vermehrung stellt die Freisetzung von Ascosporen aus Chasmotecien (syn. Chleistotecien = Überdauerungsorgane zum Überwintern) nach starkem Regen dar. Über die Vegetationsperiode durchläuft *E. necator* mehrere Runden der asexuellen Vermehrung. Dabei keimen die Konidiosporen bzw. Ascosporen auf Blättern aus und bilden ein Haftorgan, das Primärappressorium. Über dieses wird die Kutikula durchbohrt und die darunterliegende Zelle des Palisadengewebes penetriert, um ein Haustorium zur Nährstoffversorgung zu bilden. Darauf folgt die Bildung einer Primärhypho mit weiteren Appressorien und Haustorien, welche sich weiter verzweigt.

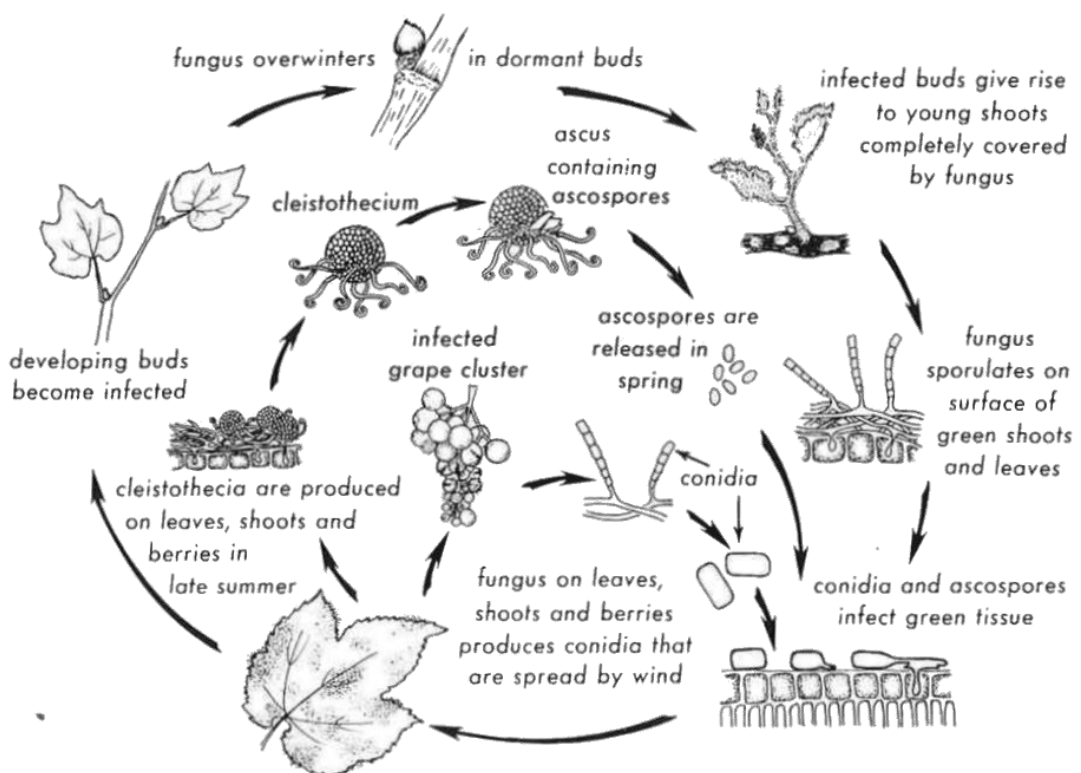


Fig. 10. Disease cycle of powdery mildew. (Drawing by R. Sticht)

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *E. necator* (Wilcox *et al.*, 2015).

Etwa fünf bis sechs Tage nach erfolgreicher Infektion, werden sogenannte Konidophoren gebildet, an welchen Konidiosporen kontinuierlich abgeschnürt werden. Diese Konidiosporen werden, nachdem sie reif sind, durch den Wind verbreitet. Dabei können sie auch sich entwickelnde Knospen befallen und im Anschluss in diesen überwintern. Ein Befall der sich entwickelnden Trauben im Erbsenstadium führt dazu, dass es bei weiterer Reife zum sogenannten „Samenbruch“ kommt, wobei die Beeren der Traube aufplatzen und der Samen sichtbar wird. Dies bildet Infektionsstellen für weitere, ubiquitär vorhandene pathogene Mikroorganismen. Die Entwicklung der Beere wird dadurch abgebrochen. Der generative Zyklus des Pilzes beginnt gegen Ende der Vegetationsperiode. Hierbei werden nach sexueller

Rekombination von Myzelien mit kompatiblen „Mating Types“ die bereits erwähnten Chasmotecien gebildet, in denen sich im Ascus die Ascosporen bilden. Nachdem die Chasmotecien ausgereift sind, lösen sie sich von den Blättern und bleiben mithilfe ihrer Haftorgane an der Rinde der Reben hängen. Dort überwintern sie bis im Frühjahr bei ausreichend hohen Temperaturen und Feuchtigkeit der neue vegetative Zyklus gestartet wird. *E. necator* ist somit zu jedem Zeitpunkt seines vegetativen Lebensabschnitts auf lebendes Gewebe angewiesen, über welches er sich mit Nährstoffen versorgen kann.

### **I.5 Bekannte Resistenzen der Weinrebe gegen den Echten Mehltau**

Für den Echten Mehltau der Weinrebe konnten in den letzten zwei Jahrzehnten insgesamt 12 natürliche Resistenzloci charakterisiert werden. Für den Großteil dieser Resistenzen konnte mittlerweile der Wirkmechanismus einer Hypersensitiven Reaktion (HR) nach Infektion mit dem Echten Mehltau nachgewiesen werden (Pap *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2015; Zandler *et al.*, 2017). Eine HR stellt eine wirkungsvolle Resistenz gegen einen obligat biotrophen Pilz wie den Echten Mehltau dar. Hierbei wird dem Pilz durch lokales Absterben des befallenen Gewebes seine Nahrungsgrundlage entzogen, sein Wachstum eingeschränkt und somit die Möglichkeit zur asexuellen Vermehrung über Konidiosporen vermindert (Agurto *et al.*, 2017; Feechan *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2015; Zandler *et al.*, 2017).

Pflanzen sind im Allgemeinen mit einer Vielzahl an Mikroorganismen konfrontiert, von denen jedoch nur ein Bruchteil virulent ist. Die Avirulenz der meisten Mikroorganismen wird durch die basale Immunität der Pflanze ermöglicht, die auf der Erkennung von sogenannten „Microbial Associated Molecular Patterns“ (MAMPs) und „Damage Associated Molecular Patterns“ (DAMPs) beruht. Jede Zelle der Pflanze muss zu einer solchen Erkennung in der Lage sein, da Pflanzen im Gegensatz zu Tieren keine mobilen Immunzellen besitzen. Durch sogenannte „Receptor like Kinases“ (RLKs) oder „Receptor like Proteins“ (RLPs) die meist transmembrane Proteine darstellen, können bereits eine Vielzahl von Mikroorganismen erkannt werden und eine generelle Resistenzantwort nach Perzeption gestartet werden. Bei den MAMPs handelt es sich meist um hochkonservierte Proteine, wie z.B. das Flagellin von Bakterien. Eine Erkennung von solchen durch RLKs oder RLPs, führt meist zur Heterodimerisierung von diesen transmembran positionierten Proteinen und einer komplexen Transphosphorylierungsabfolge mit anschließender Aktivierung von MAP-Kinase-Kaskaden (MKKs). Diese MKKs interagieren letztendlich mit Transkriptionsfaktoren um eine transkriptionelle Umprogrammierung zu bewirken was am Ende zur Resistenzantwort führt (Choi & Klessig, 2016; Jones & Dangl, 2006; Nishimura & Dangl, 2010; Sekhwal *et al.*, 2015; Spoel & Dong, 2012).

Virulente Mikroorganismen haben Wege entwickelt, um diese basale Immunität zu umgehen. Dafür werden Effektoren sekretiert, welche die Signalweiterleitung zur Resistenzantwort inhibieren. Um diese virulenten Mikroorganismen dennoch erkennen und abwehren zu können, haben Pflanzen die sogenannte „Effector Triggered Immunity“ (ETI) als zweite Ebene der Resistenz entwickelt. Hierbei erkennen spezialisierte Proteine, wie der Name verrät, die sekretierten Effektoren der Pathogene direkt oder deren Effekte auf pflanzeneigene Proteine. Bei diesen speziellen Rezeptor-Proteinen handelt es sich fast immer um sogenannte NBS-LRR (Nucleotide Binding Site – Leucine Rich Repeat) Proteine mit einer variablen N-terminalen CC- (Coiled Coil) oder TIR- (Toll/Interleucin1 Receptor) Domäne (Lee & Yeom, 2015; Nishimura & Dangl, 2010; Sekhwal *et al.*, 2015; Spoel & Dong, 2012).

Für drei der 12 bekannten natürlichen Resistenzen gegen den Echten Mehltau, konnten bereits Cluster aus solchen CC-/TIR-NBS-LRR Genen und ein Auftreten von einer lokal begrenzten HR nachgewiesen werden (Cadle Davidson *et al.*, 2016; Feechan *et al.*, 2013). Für den Rest der beschriebenen Resistenzen ist nur bekannt, dass mit einer HR auf eine Infektion mit dem Echten Mehltau reagiert wird (Pap *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2015; Zandler *et al.*, 2017)

## **I.6 Zielsetzung**

Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit war die Charakterisierung der beiden bekannten Resistenzloci *Ren3* und *Ren9* (Welter *et al.*, 2007; Zandler *et al.*, 2017) auf molekularer Ebene. Die beiden Resistenzen gegen den Echten Mehltau der Weinrebe wurden in der Rebsorte 'Regent' erstmals beschrieben und vermittelt durch eine HR, assoziiert mit den Appressorien des Pilzes, Resistenz (Fischer *et al.*, 2004; Welter *et al.*, 2007; Zandler *et al.*, 2017). Beide Resistenzen sind auf Chromosom 15 lokalisiert, wobei das Intervall von *Ren3* auf etwa 200 kb und das Intervall von *Ren9* auf etwa 2,3 Mb eingegrenzt werden konnten (Fischer *et al.*, 2004; Welter *et al.*, 2007; Zandler *et al.*, 2017; Schneider und Zyprian, unveröffentlicht).

Für die genauere Charakterisierung dieser Resistenzen, wurden nun in dieser Arbeit weitere experimentelle Kreuzungspopulationen mit bereits erarbeiteten, eng gekoppelten, genetischen Markern untersucht. Bei den Populationen handelte es sich zum einen um F1-Individuen aus der Kreuzung von 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' und zum anderen um die Nachkommen von GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc'. Die Rebsorten 'Regent', GF.GA-47-42 und 'Villard Blanc' stellen hierbei bekannte *Ren3/Ren9*-Träger dar (Welter *et al.*, 2007; Zandler *et al.*, 2017; Zyprian *et al.*, 2016). Bei der Untersuchung dieser experimentellen Kreuzungspopulationen sollte die Funktion der etablierten genetischen Marker bestätigt

werden und eine weitere Eingrenzung der genomischen Intervalle der Resistenzen vorgenommen werden. Hierfür wurden jeweils genetische Karten für die beiden Populationen erstellt und es wurden Resistenzbonituren im Freiland durchgeführt. Diese Daten wurden für QTL-Analysen in den beiden Kreuzungspopulationen verwendet.

Für die gezielte Eingrenzung des neu beschriebenen Resistenzlokus *Ren9* sollte hier ein Satz von F1-Individuen mit Rekombination auf Chromosom 15 aus experimentellen Kreuzungen ebenfalls genotypisiert und phänotypisiert werden, um anschließend eine QTL-Analyse durchführen zu können.

Durch Parallelarbeiten an dem bekannten Resistenzlokus *Ren3* waren Sequenzdaten vorhanden, die es ermöglichten, eine Analyse der dort kodierten möglichen Resistenzgene durchzuführen (Schneider und Zyprian, unveröffentlicht). Dabei sollten die Expression und die Transkripte der identifizierten Resistenzgene ermittelt werden. Zusätzlich sollten funktionelle Analysen dieser Kandidatengene durch Knock-down in 'Regent' oder Transformation in Echte Mehltau-anfällige Rebsorten eingeleitet werden.

Außerdem sollte die differentielle Genregulation von bekannten Genen der Resistenzvermittlung und der Resistenzantwort nach Inokulation mit dem Echten Mehltau untersucht werden. Ziel dieser Untersuchung ist letztendlich die Aufklärung der zellphysiologischen Reaktion, welche die Resistenz gegen den Echten Mehltau durch die Gene in den Loci *Ren3* und *Ren9* vermitteln.

## II Material und Methoden

### II.1.1 Material

#### II.1.1.1 Geräte

Anwendung	Gerät	Hersteller
<b>PCR</b>	ABI 9700 Thermocycler	Applied Biosystems, Darmstadt
	Mastercycler® personal	Eppendorf AG, Hamburg
	Mastercycler® gradient	Eppendorf AG, Hamburg
	7500 Fast DX Real Time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
<b>PCR-Fragment Analyse</b>	ABI 3130xl Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
	EC360 Maxi Cell Electrophoretic Gel System	E C Apperatus Corporation
	EC330 Midi Cell Electrophoretic Gel System	E C Apperatus Corporation
	Power Supply EC105	E C Apperatus Corporation
<b>Geldokumentation</b>	QUANTUM ST5 mit UV Leuchttisch	Vilber Lourmat GmbH
<b>Waagen</b>	Präzisionswaage M Power AZ3102	Sartorius, Göttingen
	Waage PB3015	Sartorius, Göttingen
<b>Zentrifugen</b>	Tischzentrifuge 6 16KS	Sigma, Osterode am Harz
	Tischzentrifuge 2K15	Sigma, Osterode am Harz
	MikroliterZentrifuge Z160M	Hermle, Wehingen
<b>Inkubation</b>	Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
	Wasserbad U3	Julabo, Seelbach
	Wasserbad K4R Electronic	mgw Lauda
	Brutschrank B 20	Heraeus Instruments, Hanau
	Schüttelinkubator 3031	GFL mbH, Burgwendel
	Klimaschrank SE 41 PGC Percival	CLF PlantClimatics GmbH
	Klimakammer	Weisshaar GmbH & Co. KG,
<b>Mikroskopie</b>	Olympus VM VMZ 1x – 4x	Olympus Europa SE & Co. KG,
	Lichtquelle KL1500 electronic	Schott AG,
	M205 FA 1x – 160x	Leica, Wetzlar
	Fluoreszenzmikroskop DM4000B	Leica, Wetzlar
	Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda Königshofen
<b>Probenmischer</b>	Vortex Genie 2™	Scientific Industries, Bohamia, NY USA
	IKA RCT B (Magnetrührer)	IKA Labortechnik, Staufen
<b>Aufschluss Blattmaterial</b>	Tissuelyser RETSCH	Quiagen GmbH, Hilden
<b>Probenaufbewahrung</b>	Kühlschrank +4°C	Robert Bosch GmbH
	Gefrierschrank 20°C	Liebherr International AG,
	Gefrierschrank 70°C	Skadi,
<b>Photometer</b>	CLARIOstar®	BMG Labtech GmbH
<b>Sterilbank</b>	Safe 2020 Class II Bio. Safty Cabinet	Thermo Fischer Scientific
<b>pH Meter</b>	Consort C680	Consort bvba,
<b>Sonstiges</b>	Mikrowelle Privileg 7020	Bauknecht Hausgeräte GmbH



### II.1.1.2 Software und Datenbanken

Anwendung	Software	Hersteller
<b>Photometer</b>	CLARIOstar Reader Control	BMG Labtech GmbH
	MARS Data analysis	BMG Labtech GmbH
<b>PCR-Fragment Analyse</b>	QUANTUM ST5	Vilber Lourmat GmbH
	GeneMapper 5	Applied Biosystems, Darmstadt
<b>Genetische Karten</b>	JoinMap 4.1	Kyazma, Wageningen, Niederlande
<b>QTL-Analyse</b>	MapQTL 6	Kyazma, Wageningen, Niederlande
<b>QTL Visualisierung</b>	MapChart 2.3	Voorrips 2002
<b>SSR-Marker design</b>	WebSat	Martins et al., 2009 ( <a href="http://wsmartins.net/websat">http://wsmartins.net/websat</a> )
<b>Bioinformatik</b>	CLC Main Workbench 7.7.3	Qiagen Aarhus A/S
	CLC Genomics Workbench 6.5.1	Qiagen Aarhus A/S
	blastn, blastp, blastx, CD search	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
	blastn	<a href="http://www.gramene.org">www.gramene.org</a>
	blastn, blat search	<a href="http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/">www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/</a>
	FGENESH	Softberry (Solovyev et al., 2006)
	webPRANK	<a href="http://www.ebi.ac.uk/goldman_srv/webprank/">www.ebi.ac.uk/goldman_srv/webprank/</a>
	LTRharvest	Ellinghaus et al., 2008
	Primer3Plus 2.4.0	Untergasser et al., 2012
	Tm Calculator	Thermo Fischer Scientific
WMD3	MPI, Developmental Biology, Tübingen	
<b>Datenbanken</b>	NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
	Gramene	<a href="http://www.gramene.org">www.gramene.org</a>
	CRIBI	<a href="http://genomes.cribi.unipd.it/grape/index.php">http://genomes.cribi.unipd.it/grape/index.php</a>
	Genoscope	<a href="http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/">www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/</a>
	TAIR	<a href="http://www.arabidopsis.org">www.arabidopsis.org</a>
	GBVitis	JKI/DV S.Kecke, G.Marx, A.Ganesh v6.4
	VIVC	<a href="http://www.vivc.de">www.vivc.de</a>
<b>Statistik</b>	R 3.2.4 und R Studio 0.99.892	R Foundation for statistical computing und R Studio, Inc.

### II.1.1.3 Bakterienstämme

#### *Escherichia coli* **DH5 $\alpha$** :

Genotyp: *fhuA2, lac(del)U169, phoA, glnV44, F80', lacZ(del)M15, gyrA96, recA1, relA1, endA1, thi-1, hsdR17*

#### *Escherichia coli* **HB101**:

Genotyp: *F-, Lambda $\bar{c}$ , araC14, leuB6(Am), DE(gpt proA)62, lacY1, glnX44(AS), galK2(Oc), recA13, rpsL20(strR), xylA5, mtl-1, thiE1, hsdS20(rB $\bar{c}$ , mB $\bar{c}$ )*

#### *Escherichia coli* **Stellar<sup>TM</sup>**:

Genotyp: *F $\bar{c}$ , endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA,  $\Phi$ 80d lacZ $\Delta$  M15,  $\Delta$  (lacZYA - argF) U169,  $\Delta$  (mrr - hsdRMS - mcrBC),  $\Delta$ mcrA,  $\lambda$  $\bar{c}$*

#### *Agrobacterium tumefaciens* **EHA101**:

Resistenz: Rifampicin (chromosomaler Resistenzmarker), Kanamycin

Ti Plasmid: pEHA101(pTiBo542DT-DNA)

*Agrobacterium tumefaciens* **EHA105:**

Resistenz: Rifampicin (chromosomaler Resistenzmarker)

Ti Plasmid: pEHA105(pTiBo542DT-DNA)

**II.1.1.4 Vektoren**

	pJET1.2/Blunt <sup>1</sup>	pRS300 <sup>2</sup>	pRK2013 <sup>3</sup>	pGJ-GFP <sup>5</sup>	pLH9070 <sup>6</sup>
<b>Selektion</b>	Ampicillin	✓	✓		
	Chloramphenicol				
	Kanamycin			✓	✓ (Pflanze)
	Phosphinothricin				✓ (Pflanze)
	Spectinomycin				✓
	Tetracyclin				
<b>ORI</b>	p15A				
	pMB1	✓			
	pUC		✓		
	pVS1				✓
	ColE1			✓	✓
<b>Features</b>	MCS	✓	✓	✓	✓
	T7/SP6 Promotor		✓		
	<i>Eco47IR</i>	✓			
	miR319a		✓		
	<i>GFP</i>				✓

<sup>1</sup>Nilsson et al., 1983

<sup>5</sup>Guido Jach

<sup>2</sup>Schwab et al., 2006

<sup>6</sup>Hausmann and Töpfer, 1999

<sup>3</sup>Figurski and Helinski, 1979

**II.1.1.5 Kits**

Kit	Methode
Sigma Spectrum™ Plant total RNA Kit	Extraktion von Gesamt RNA aus Blättern
Gel und PCR Clean up (Macherey Nagel)	Aufreinigung von PCR-Fragmenten
CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fischer)	Klonierung von PCR Fragmenten
In-Fusion® HD Cloning Plus CE	Klonierung von Kandidatengenen
GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fischer)	Aufreinigung von Plasmid DNA
PeqGOLD Plant DNA Mini Kit (Peqlab)	Aufreinigung von gesamt DNA aus Blättern
NucleoSpin® 96 Plant II (Macherey Nagel)	Aufreinigung von gesamt DNA aus Blättern
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)	cDNA Synthese von gesamt RNA

**II.1.1.6 Puffer, Medien und Lösungen**

**50x TAE (1 l) pH 8,3:**

Tris	242 g (2 M)
Eisessig	57,1 ml (1 M)
EDTA (0,5 M) pH 8,0	100 ml (50 mM)
H <sub>2</sub> O (bidest.)	ad 1 l

**LB Medium (1 l):**

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O (bidest.)	ad 1 l
Für Agarplatten: Bacto Agar	15 g

**Trypanblau Färbelösung (150 ml):**

Milchsäure (D/L)	12,5 ml
Glycerin (99 %)	12,5 ml
H <sub>2</sub> O (bidest.)	25 ml
Trypanblau	0,4 g
Ethanol (100 %)	100 ml

**TfB1 (100 ml) pH 5,8 (steril filtrieren):**

KCl	0,745 g (100 mM)
MnCl <sub>2</sub>	0,989 g (50 mM)
CaCl <sub>2</sub>	0,147 g (10 mM)
Glycerin	15 ml (15 % v/v)
K Acetat	0,294 g (30 mM)
H <sub>2</sub> O (bisdest.)	ad 100 ml

**TfB2 (20 ml) pH 7 (steril filtrieren):**

Mops	0,042 g (10 mM)
RbCl	0,024 g (10 mM)
CaCl <sub>2</sub>	0,221 g (75 mM)
Glycerin	3 ml (15 % v/v)
H <sub>2</sub> O (bidest.)	ad 20 ml

## II.1.2 Pflanzenmaterial und *E. necator* Sporen

### II.1.2.1 Freilandpflanzen

Für genetische Kartierung und Resistenzbonituren wurden F1-Individuen der Kreuzungspopulationen 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' und GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' verwendet. Dabei handelte es sich um 236 F1-Individuen im Einzelstock für 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' und 149 (Kernpopulation) beziehungsweise 1050 (erweiterte Population) Individuen für GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc'. Beide Populationen sind am Standort JKI Geilweilerhof, Siebeldingen (49°12'54.1''N, 8°02'41.3''E) wurzelecht angepflanzt. Die Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' wurde im Jahr 2016 bis auf eine Austriebsspritzung nicht mit Fungiziden behandelt, um eine natürliche Infektion der Population zu gewährleisten. Ansonsten umfasst das Sortiment des JKI Geilweilerhofs etwa 4300 gesammelte Akzessionen und Zuchtlinien, auf welche im Zuge der Suche nach rekombinanten *Ren3*-Trägern zurückgegriffen wurde.

### II.1.2.2 Stecklinge

Stecklinge von ausgewählten Genotypen wurden im Frühjahr aus einjährigen Ruten geschnitten. Es wurden Zweiaugen-Stecklinge geschnitten und das untere Auge entfernt, um einen Austrieb des oberen Auges zu gewährleisten. Die Stecklinge wurden anschließend über Nacht gewässert und im folgenden Schritt in 0,5 % Chinosol gebadet, um Pilzinfektionen

vorzubeugen. Die vorbereiteten Stecklinge wurden im Anschluss in „Jiffy’s“ angezogen und nach erfolgreichem Austrieb und Bewurzelung getopft. Nach dem Austrieb wurden die Pflanzen auf eine Rute zurückgeschnitten und regelmäßig gegipfelt.

### **II.1.2.3 *In vitro* Pflanzen**

Um steriles und physiologisch angepasstes Pflanzenmaterial für Infektionsversuche verwenden zu können, wurden ausgewählte Genotypen in *in vitro* Kultur unter Langtag Bedingungen (16h Licht, 8h dunkel, 20 – 22 °C) gehalten. *In vitro* Pflanzen wurden auf MS233 (Duchefa, 2,3 g/l) mit Saccharose (0,11 M) und Gelrite (0,5 % (w/v), pH 5,8) gezogen und in einem regelmäßigen Turnus von 12 Wochen über Einaugen-Stecklinge vermehrt.

### **II.1.2.4 *Erysiphe necator* Sporenmaterial**

Sporenmaterial von *E. necator* wurde für Infektionsversuche von Blättern von anfälligen Genotypen wie 'Lemberger', 'Müller Thurgau' oder 'Cabernet Franc' abgenommen, welche unter kontrollierten Bedingungen im Frühjahr als Stecklinge im Gewächshaus oder in der Klimakammer gezogen wurden. Ergebnisse zur Untersuchung der genetischen Diversität der *E. necator* Isolate mithilfe von SSR-Markern ergab, dass es sich bei den verwendeten Sporen um Mischungen aus vier oder mehr Isolaten handelt (Masterarbeit, Doreen Adam, 2016, AG Zyprian). Für Infektionsversuche wurden Sporen verwendet, welche oval, glasig bzw. transparent unter dem Binokular erschienen. Dieses Stadium der Sporen ist etwa 10 bis 14 Tage nach der Infektion vorzufinden.

## **II.2 Methoden**

### **II.2.1 Resistenzbonitur**

#### **II.2.1.1 Freiland**

Resistenzbonituren im Freiland wurden von zwei Personen unabhängig durchgeführt. Im Jahr 2016 wurde die Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' zu unterschiedlichen Zeitpunkten bonitiert. Dabei wurde auf das Boniturschema der OIV (Internationale Organisation für Reben und Wein, [www.oiv.int/de](http://www.oiv.int/de), OIV 455) zurückgegriffen, jedoch wurde die Skala invers verwendet. Dabei war 1 resistent bzw. ohne Anzeichen von Infektionen und 9 Infektionen über das komplette Blatt am kompletten Stock (Zyprian et al., 2016, Zandler et al., 2017). Die phänotypische Evaluierung der F1-Individuen der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' wurde im zeitlichen Verlauf der Vegetationsperiode 2016 viermal wiederholt, um den Fortschritt der Infektionen zu detektieren. Das Intervall der

Wiederholungen lag zwischen drei bis sechs Wochen beginnend Ende Juni und endend Mitte Oktober (25-06-16, 29-07-16, 18-08-16, 12-10-16). Bei der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x ‘Villard Blanc‘ wurde auf bereits bestehende Boniturdaten aus vorangegangenen Jahren zurückgegriffen. Hier wurden die Datensätze der Jahre 1999, 2000, 2003, 2005 und 2006 für die spätere QTL-Analyse verwendet.

#### **II.2.1.2 „Detached leaf assay“**

Für kontrollierte Infektionen von ausgewählten Genotypen, wurden Blätter auf 1 % Wasseragar gelegt und mit frischen Sporen von *E. necator* bepinselt. Die Blätter wurden in der Klimakammer unter Langtagbedingungen inkubiert (16h Licht, 8h Dunkel, 20 – 23 °C, 60 % rH). Für die Betrachtung von Infektionen und einer Detektion einer Hypersensitiven Reaktion, wurden die Blätter über einen Zeitraum von neun Tagen regelmäßig mithilfe eines Stereomikroskop (Leica 205 FA) beobachtet.

### **II.2.2 Färbemethoden**

#### **II.2.2.1 Trypanblau-Färbung**

Für die Färbung von *E. necator* und nekrotischem Gewebe, wurde eine Trypanblau-Färbung in einem etwas abgeänderten Protokoll verwendet (Keogh *et al.*, 1980; Peterhänsel *et al.*, 1997). Blätter wurden nach der gewünschten Inkubationszeit in 15 ml Falcons überführt, mit der Trypanblaulösung bedeckt und für 2 – 3 Minuten bei 99 °C im Wasserbad gekocht. Die Färbelösung wurde am folgenden Tag abgenommen, die Blätter mit 100 % EtOH gewaschen und mit 70 % EtOH über einen Zeitraum von zwei bis fünf Tagen entfärbt (Keogh *et al.*, 1980; Peterhänsel *et al.*, 1997). Die entfärbten Blätter wurden anschließend mit einem Stereomikroskop betrachtet.

#### **II.2.2.2 Calcofluor White Färbung**

Für eine gezielte Färbung von pilzlichem Gewebe wurde eine Calcofluor White Färbung durchgeführt. Ein Tropfen (ca. 30 µl) von Calcofluor White (Sigma Aldrich, Calcofluor White M2R 1 g/l, Evans blue 0,5 g/l) wurde zusammen mit einem Tropfen (ca. 30 µl) einer 10 % KOH Lösung auf ein 0,5 cm<sup>2</sup> großes Stück Blatt gegeben, eine Minute inkubiert und anschließend mit Wasser so oft gewaschen, bis keine lilafarbenen Schlieren mehr zu erkennen waren (Protokoll Sigma Aldrich). Die Proben wurden direkt danach mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Leica DM4000B, Anregung 355 nm).

## II.2.3 DNA Extraktion

### II.2.3.1 Einzelaufreinigung

DNA von einzelnen Proben, wurde mithilfe und nach Anleitung des PeqGOLD Plant DNA mini Kit (PeqLAB, Erlangen, Deutschland) extrahiert.

### II.2.3.2 96 Well Extraktion

Für die DNA Extraktion der 244 F1-Individuen der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' wurde das Nucleospin 96 II DNA Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Die Extraktion wurde nach dem mitgelieferten Protokoll des Kits durchgeführt.

## II.2.4 Erstellung von Oligonukleotiden für PCR Reaktionen

Für PCR Reaktionen jeglicher Art wurden die verwendeten Oligonukleotide in gleicher Weise generiert. Bereiche von 18 – 30 bp mit einem GC Gehalt von 40 – 50 % wurden gegen das Referenzgenom PN40024 12Xv0 (Jaillon et al., 2007) und die 'Regent' „Next Generation Sequencing“ (NGS) Datenbank „aligned“ (blast-n, CLC Mainworkbench, Match 1, Mismatch 4). Bei der 'Regent' NGS-Datenbank handelte es sich um Contigs (> 1kb) aus einem *de novo* Assembly von „Whole Genome Shotgun“ (WGS) Illumina Sequenzierdaten (Hausmann, unveröffentlicht). Bei Oligonukleotiden, welche spezifisch die 'Chambourcin' Haplophase von 'Regent' amplifizieren sollten, wurde darauf geachtet, dass es keine spezifischen Treffer bei blast n gegen das Referenzgenom gab. Für hoch konservierte Bereiche wurde darauf geachtet, dass es mindestens zwei bis drei SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) am 3'-Ende des Oligonukleotids gab, um seine Bindung in diesem Bereich zu destabilisieren und eine falsch positive Amplifikation zu verhindern. Die so generierten Oligonukleotide wurden im nächsten Schritt auf ihre spezifische  $T_m$  mithilfe von Primer3Plus (Untergasser et al., 2012, <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) überprüft. Es wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperatur in einem Bereich zwischen 55 bis 65 °C lag.

Ausnahmen bildeten hierbei Oligonukleotide, welche für die Amplifikation von Kandidatengenomen mit nativem Promotor und Terminator generiert wurden. Hierbei wurden an den 5'-Enden jeweils homologe Sequenzen (mindestens 15 Nukleotide) zum Zielvektor angehängt damit diese Amplifikate mithilfe des In-Fusion cloning Kits (Takara) in den Zielvektor eingebracht werden konnten. Ihre Spezifität wurde jedoch wie zuvor beschrieben gewährleistet.

## II.2.5 Design von genetischen Markern

### II.2.5.1 SSR-Marker

Für die genetische Kartierung von Chromosom 15 wurden neue SSR-Marker generiert. Dafür wurde in interessanten Bereichen von Chromosom 15 des Referenzgenoms PN40024 12Xv0 (Jaillon et al., 2007) mithilfe des Online Programms WebSat (Martins et al., 2009 <http://wsmartins.net/websat>) nach di-, tri-, tetra-, penta- oder hexa-Repeats mit mindestens 6 Wiederholungen gesucht. Bereiche, mit den angegebenen Repeat-Mustern wurden anschließend gegen die NGS-Datenbank von 'Regent' „aligned“ (blast-n, CLC Mainworkbench, Match +1, Mismatch -4) und nach Polymorphismen gesucht, die größer waren als fünf Basenpaare. Für Bereiche mit entsprechenden Polymorphismen zwischen den Haplophasen wurden flankierende Oligonukleotide generiert, welche anschließend in einer PCR mit 'Regent', 'Diana', 'Chambourcin', 'Lemberger' und 'Cabernet Sauvignon' getestet wurden. War nach der Gelelektrophorese der PCR-Fragmente ein Polymorphismus im Gel erkennbar wurden die getesteten „forward“ Oligonukleotide der Marker fluoreszenzmarkiert bestellt (FAM, HEX, ROX, TAMRA), um sie für eine Analyse mit dem Kapillarsequenzierer ABI-3130xl verwenden zu können.

### II.2.5.2 InDel-Marker

Für die Generierung von InDel-Markern wurden ebenfalls Bereiche von Chromosom 15 gegen die NGS-Datenbank von 'Regent' „aligned“ und nach Insertionen bzw. Deletionen, die größer als 10 bp waren, gesucht. Für Bereiche mit den beschriebenen Eigenschaften wurden ebenfalls flankierende Oligonukleotide generiert, welche ebenfalls in einer PCR mit den oben angeführten Genotypen getestet wurden. Diese Marker wurden jedoch nicht fluoreszenzmarkiert verwendet.

## II.2.5 PCR

### II.2.5.1 Kapa HiFi Hot-start

Für die Amplifikation von großen PCR-Fragmenten wurde das Kapa HiFi Hot-start Kit (KapaBiosystems) verwendet. Durch die Salzkonzentration von 2 mM MgCl<sub>2</sub> im 5x Kapa HiFi Puffer und die 3' → 5' Exonukleaseaktivität („Proof Reading“), welche erst durch die initiale Denaturierung (Hot-start) aktiv wird, ist diese Polymerase gut geeignet für eine hohe Amplifikationsrate mit einer minimalen Fehlerrate. Die Zusammensetzung des Master-Mixes und die Bedingungen der PCR-Reaktion wurden dem mitgelieferten Protokoll entnommen.

### **II.2.5.2 Phusion HiFi**

Für die Amplifikation mit einer höheren Stringenz wurde das Phusion HiFi Kit (Thermo Fischer) verwendet. Die mitgelieferten Puffer enthalten 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> wodurch die Aktivität geringer ist als bei dem vorher genannten Kapa HiFi Hot start Kit. Diese Polymerase besitzt ebenfalls eine 3' → 5' Exonuklease Aktivität („Proof Reading“) jedoch ist diese ohne initiale Denaturierung aktiv. Dadurch muss darauf geachtet werden, dass der Master-Mix erst direkt vor dem eigentlichen Einsatz mit der Polymerase versetzt wird, da ansonsten ein Abbau der beigesetzten einzelsträngigen Oligonukleotide stattfinden kann. Die spezifische T<sub>m</sub> wurde mithilfe des T<sub>m</sub>-Calculator (Thermo Fischer scientific) für jede PCR Reaktion berechnet. Die Zusammensetzung des Master-Mixes und die PCR-Reaktion Bedingungen wurden dem mitgelieferten Protokoll entnommen.

### **II.2.5.3 Kapa2G Multiplex Mix**

Für die Analyse von genetischen Markern im Multiplexverfahren wurde das Kapa2G Multiplex-Mix Kit (KapaBiosystems) verwendet. Dieses Kit wurde als fertiger Master-Mix geliefert und anschließend in einem 10 µl Ansatz verwendet, in dem bis zu fünf unterschiedliche genetische Marker gleichzeitig amplifiziert wurden. Der Puffer dieser Polymerase ist mit 3 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt, wodurch die Polymerase eine geringe Stringenz besitzt und somit auch bei einer nicht perfekten Bindung der Oligonukleotide eine Amplifikation ermöglicht. Bei der Analyse von SSR-Markern ermöglicht diese Robustheit gegenüber SNPs eine erfolgreiche Amplifikation über ein breites Spektrum von unterschiedlichen Genotypen.

## **II.2.6 Fragmentlängenanalyse**

### **II.2.6.1 Gelelektrophorese**

Amplifizierte PCR-Fragmente wurden mithilfe einer Gelelektrophorese auf Agarosegelen ihrer Länge nach aufgetrennt. Dabei wurden unterschiedliche Agarosekonzentrationen verwendet, um je nach erwarteter Fragmentgröße eine möglichst optimale Auftrennung zu gewährleisten. Für Fragmente kleiner als 1 kb wurden 2 % - 3 % Agarosegele verwendet, für Fragmente zwischen 1 – 5 kb 1 % Agarosegele und für Fragment größer als 5 kb 0,8 % Agarosegele.



### II.2.6.2 Kapillarsequenzierer

Für die Analyse von genetischen Markern wurde ein Kapillarsequenzierer (ABI-3130xl, Applied biosystems) mit einer 36 cm 16-Kanal-Kapillare verwendet. Durch die fluoreszenzmarkierten PCR-Fragmente konnten hierbei bis zu fünf unterschiedliche genetische Marker in einer Probe gleichzeitig analysiert werden. Zusätzlich zu den PCR-Fragmenten wurde ein Größenstandard beigesetzt, welcher mit dem Fluoreszenzfarbstoff LIZ<sup>®</sup> markiert war und dem kommerziell erwerblichen GeneScan<sup>™</sup> 500 LIZ<sup>®</sup> entsprach. Die Auswertung der Fragmentlängen erfolgte anschließend mit der GeneMapper<sup>®</sup> 5.0 Software (Applied Biosystems) (Zendler et al., 2017).

### II.2.7 Erstellen von genetischen Karten

Für die Erstellung einer genetischen Karte für Chromosom 15 von ‘Regent’ x ‘Cabernet Sauvignon’ und GF.GA-47-42 x ‘Villard Blanc’ wurde das Programm JoinMap 4.1 (Kyazma, Wageningen, Niederlande) verwendet. Die erhaltenen Allel-Kombinationen der GeneMapper<sup>®</sup> 5.0 Auswertung der Multiplex PCR wurden anhand der JoinMap 4.1 Anleitung in MS Excel in die fünf möglichen Segregationsmuster umkodiert und anschließend in JoinMap 4.1 geladen (Tabelle 1). Selbstungsprodukte, Individuen mit weniger als 70 % Information für alle analysierten genetischen Marker und Individuen, welche Fremddallele aufwiesen, wurden nicht für die Kartierung verwendet. Es wurde das Dataset CP („Cross Population“) verwendet.

**Tabelle 1:** Die möglichen Segregationsmuster, welche in einer Kreuzungspopulation (CP, JoinMap 4.1) auftreten können und ihre Kodierung für die Verrechnung in JoinMap 4.1 (JoinMap 4.1 Manual, J.W. van Oijen 2006).

Segregation	Beschreibung	Mögliche Kombinationen
<ab x cd>	Lokus heterozygot bei beiden Eltern, vier Allele	ac, ad, bc, bd
<ef x eg>	Lokus heterozygot bei beiden Eltern, drei Allele	ee, ef, eg, fg
<hk x hk>	Lokus heterozygot bei beiden Eltern, zwei Allele	hh, hk, kk
<lm x ll>	Paternal homozygot	lm, ll
<nn x np>	Maternal homozygot	nn, np

Die Gruppierung der genetischen Marker wurde anhand des „Groupings Tree“ (ab LOD 2.0) vorgenommen. Für die Berechnung der integrierten genetischen Karte aus ‘Regent’ und ‘Cabernet Sauvignon’ bzw. GF.GA-47-42 und ‘Villard Blanc’ wurde der „Maximum Likelihood Mapping“ (ML-mapping) Algorithmus mit den Standardeinstellungen verwendet. Im Anschluss daran wurden die Datensätze der beiden Populationen in einen maternalen und paternalen Datensatz umgewandelt und als doppelt haploide (DH) Population ebenfalls mit dem ML-Algorithmus verrechnet. Die Allele wurden hierfür entsprechend der Anleitung von JoinMap 4.1 kodiert.

## II.2.8 QTL-Analyse

Für die Verrechnung von phänotypischen Merkmalen, in diesem Fall Resistenz gegen *E. necator*, mit den berechneten genetischen Karten und die Detektion von Quantitative-Trait-Loci (QTLs) wurde das Programm MapQTL 6.0 (Kyazma, Wageningen, Niederlande) verwendet. Für die QTL-Analyse wurden jeweils die integrierten genetischen Karten sowie die maternale und paternale Karte der beiden Populationen mit den erhobenen Boniturdaten verrechnet. Es wurde jeweils eine Kruskal-Wallis (KW)-Analyse, ein Intervall-Mapping (IM) und ein Multiple QTL-Mapping (MQM) zur Detektion von möglichen unterdrückten QTLs durchgeführt. Für das MQM wurde zuvor eine automatische Co-Faktor Selektion (ACS) durchgeführt ( $p$  value  $< 0,005$ ). Für die Bestimmung des Chromosom-spezifischen LOD („logarithm of the odds“) Signifikanzschwellenwert ( $p$  value  $< 0,05$ ) wurde ein Permutations-Test mit 1000 Wiederholungen durchgeführt.

## II.2.9 Statistische Analysen

Für statistische Analysen wurde die Software R Studio 0.99.892 (R Foundation for statistical computing und R Studio, Inc.) verwendet.

### II.2.9.1 Paardifferenztest

Für die Untersuchung auf signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) von zwei Datensätzen zueinander wurde ein Paardifferenztest durchgeführt mit dem Befehl `pairwise.t.test()` mit Bonferroni Anpassung.

## II.2.10 Klonierung von PCR-Fragmenten

### II.2.10.1 Klonieren von PCR-Fragmenten zum Sequenzieren

Für die Sequenzierung von spezifischen PCR-Fragmenten wurden diese nach einer Gelelektrophorese aus den Gelen ausgeschnitten, aufgereinigt und in das Plasmid pJET1.2/Blunt kloniert. Hierdurch wird gewährleistet, dass das komplette Fragment in Forward- und Reverse-Richtung sequenziert werden kann ohne den Verlust der ersten 20 bp, welche bei einer Sequenzierung meistens durch ein starkes Hintergrundrauschen nicht klar bestimmt werden können.

#### II.2.10.1.1 Herstellung von chemokompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$ Zellen

Für Klonierungsarbeiten wurden chemokompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen verwendet. Für die Herstellung der kompetenten Bakterien wurde zunächst 20 ml LB Medium mit einer Einzelkolonie von *E. coli* DH5 $\alpha$  beimpft und bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator

über Nacht inkubiert. Die Hauptkultur (200 ml LB Medium) wurde mit 1 % der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Ab einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde die Hauptkultur 30 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde die Hauptkultur auf vier 50 ml Falcon Röhren aufgeteilt und 10 Minuten bei 1000g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Die Pellets wurden in je 15 ml Tfb1 Puffer resuspendiert und der Inhalt von jeweils zwei Falcon-Röhren wurde vereinigt. Nach einer Stunde auf Eis wurden die Zellen bei einer achtminütigen Zentrifugation bei 1000g und 4 °C wieder pelletiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurden die pelletierten Zellen in jeweils 4 ml Tfb2 Puffer resuspendiert. Abschließend wurden die kompetenten Zellen in je 50 µl Aliquotes portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert (Hanahan, 1983, 1985).

### II.2.10.1.2 Ligation

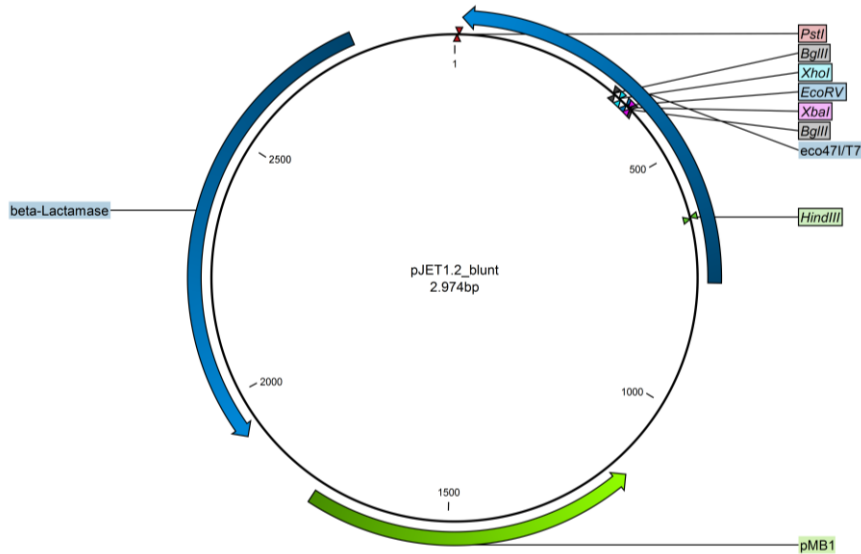
Um spezifische PCR-Fragmente zu sequenzieren wurden diese nach der Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des Gel- und PCR-Clean up Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Einzige Änderung zum mitgelieferten Protokoll war eine zweiminütige Inkubation bei 50 °C vor der Elution um mögliche Ethanol-Rückstände zu beseitigen. Es wurde mit zweimal 15 µl Elutionspuffer eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die so aufgearbeiteten PCR-Fragmente wurden anschließend für eine Ligation in das Plasmid pJET1.2/Blunt (Thermo Fischer) verwendet. Das verwendete Verhältnis von Insert zu Plasmid war 3 : 1 und wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Insert}(ng) = \frac{\text{Länge Insert (bp)}}{\text{Länge Plasmid (bp)}} \times \text{Plasmid}(ng) \times 3 \text{ (Verhältnis 3:1)}$$

**Tabelle 2:** Zusammensetzung des 20µl Ligationsansatz für die Ligation eines aufgereinigten PCR-Fragments in das Plasmid pJET1.2/Blunt.

10x T4-DNA Ligase Puffer	2 µl
Insert (3x)	x µl
pJET1.2/Blunt (50 ng/µl)	1 µl
PEG4000	2 µl
T4-DNA Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 20 µl

Der in Tabelle 2 angeführte Ligationsansatz wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Plasmid pJET1.2/Blunt wurde bereits durch *EcoRV* ( $\begin{matrix} 5' \dots \text{GAT} \uparrow \text{ATC} \dots 3' \\ 3' \dots \text{CTA} \downarrow \text{TAG} \dots 5' \end{matrix}$ ) linearisiert geliefert (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des pJET1.2/Blunt Plasmids ohne Insert. Blau markierte Abschnitte beziehen sich auf Gene mit offenem Leseraster. Der Replikationsursprung (ORI) wurde grün eingezeichnet. Gängige Restriktionsendonukleasen der MCS sind als Flaggen eingezeichnet. (pMB1 = Origin of Replication (high copy), beta-Lactamase = Ampicillin Resistenz, *Eco47IR* = Restriktionsendonuklease)

Bei einer erfolgreichen Integration des Inserts in das Plasmid wird das Leseraster des Gens, welches für die Restriktionsendonuklease *Eco47IR* kodiert zerstört. Diese Restriktionsendonuklease ist im aktiven Zustand dafür verantwortlich, dass das Genom von *E. coli* geschnitten und dadurch zerstört wird, was zum Absterben des Bakteriums führt. Das Plasmid kodiert zudem eine Resistenz gegen Ampicillin wodurch Bakterien, welche erfolgreich mit dem Plasmid-Insert Konstrukt transformiert wurden auf  $LB^{Amp^+}$  (100  $\mu$ g/ml) angezogen werden können (Abbildung 2, beta-Lactamase).

### II.2.10.1.3 Transformation

Der Ligationsansatz wurde nach der Inkubation bei Raumtemperatur direkt für die Transformation von kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen eingesetzt. Dafür wurden 5  $\mu$ l des Ansatzes zu 50  $\mu$ l auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen gegeben. Diese wurden weitere 30 min auf Eis inkubiert bevor sie dann für 30 sec einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen wurden. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde 450  $\mu$ l LB Medium zu den Zellen gegeben und diese für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. In dieser Regenerationszeit sollten die Transkription und Translation der beta-Lactamase stattgefunden haben, wodurch die Zellen anschließend auf  $LB^{Amp^+}$  ausplattiert werden konnten. Die  $LB^{Amp^+}$  Agarplatten mit dem ausplattierten Transformationsansatz wurden anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### II.2.10.1.4 Selektion von positiven Klonen

Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden am nächsten Tag einzelne Kolonien in Flüssigmedium mit Ampicillin (100 µg/ml) überimpft und ebenfalls über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Zwei Milliliter der Flüssigkultur wurden anschließend für eine Plasmid-Präparation mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fischer) verwendet. Die Präparation wurde nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt.

**Tabelle 3:** Ansatz der Restriktionsanalyse der präparierten Plasmide mit *BglIII*.

Plasmid (500 ng)	x µl
Puffer Orange	2 µl
<i>BglIII</i>	1 µl
H <sub>2</sub> O (Licrosolv <sup>®</sup> )	ad. 20 µl

Das präparierte Plasmid wurde in einem 20 µl Ansatz mit *BglIII* geschnitten (Tabelle 3). Durch die beiden *BglIII* Schnittstellen, welche die Multiple Cloning Site (MCS) flankieren (Abbildung 2), wird durch diese Restriktionsanalyse das Insert aus dem Plasmid geschnitten und somit kann durch eine Gelelektrophorese das Insert anhand seiner Größe auf seine Richtigkeit kontrolliert werden. Plasmide, die die richtige Insertgröße aufwiesen, wurden sequenziert.

### II.2.10.2 Klonieren von *GFP* in pLH9070

Für spätere Transformationen von anfälligen Genotypen mit Kandidatengen aus dem *Ren3* Locus wurde ein Kontrollplasmid mit *GFP* als Reportergen hergestellt. Hierfür wurde das Plasmid pLH9070 verwendet, in welches *GFP* mit 35S-Promotor und -Terminator aus pGJ-*GFP* ligiert wurde. Das Plasmid pLH9070 kodiert in der T-DNA neben einer Resistenz gegen Kanamycin (*nptII*, Neomycin-Phosphotransferase-II) ebenfalls eine Resistenz gegen Phosphinothricin (*bar*, Phosphinothricin Acetyltransferase) für eine spätere Doppelsektion der transformierten Pflanzen.

#### II.2.10.2.1 Ligation

Die *GFP* Kassette von pGJ-*GFP* wurde über *HindIII* ausgeschnitten und für eine Ligation in pLH9070 wurde dieses ebenfalls mit *HindIII* geschnitten (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Die Restriktionsansätze für pLH9070 und pGJ-*GFP* mit *HindIII*.

	pLH9070	pGJ- <i>GFP</i>
Plasmid (2 µg)	3,7 µl	24,4 µl
<i>HindIII</i> Puffer	5 µl	5 µl
10x BSA	5 µl	5 µl
<i>HindIII</i>	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	35,3 µl	14,6 µl

Der Ansatz von pLH9070 wurde direkt mit dem Gel- und PCR-Clean up Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Die Restriktion von pGJ-*GFP* wurde über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und die *GFP*-Kassette (1860 bp) wurde ausgeschnitten und ebenfalls mit dem Gel- und PCR-Clean up Kit aufgereinigt. Um eine Religierung von pLH9070(*HindIII*) während der Ligation zu verhindern wurden die entstandenen 5'-Enden mit dem Enzym alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Der Ansatz für die alkalische Phosphatase (FastAP, Thermo Fischer) ist in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5:** Ansatz zum Dephosphorylieren der 5'-Enden von pLH9070 mit FastAP

pLH9070 ( <i>HindIII</i> )	10 $\mu$ l
10x FastAP Puffer	2 $\mu$ l
FastAP	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidest.	7 $\mu$ l

Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung der FastAP bei 75 °C für fünf Minuten abgestoppt. Der Ansatz wurde mit dem Gel und PCR Clean up Kit aufgereinigt und in 30  $\mu$ l eluiert. Die aufgereinigte *GFP*-Kassette wurde nun in den vorbereiteten pLH9070 (*HindIII*, dephosphoryliert) ligiert. Der Ansatz für die Ligation ist in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6:** Ansatz für die Ligation der *GFP*-Kassette in pLH9070.

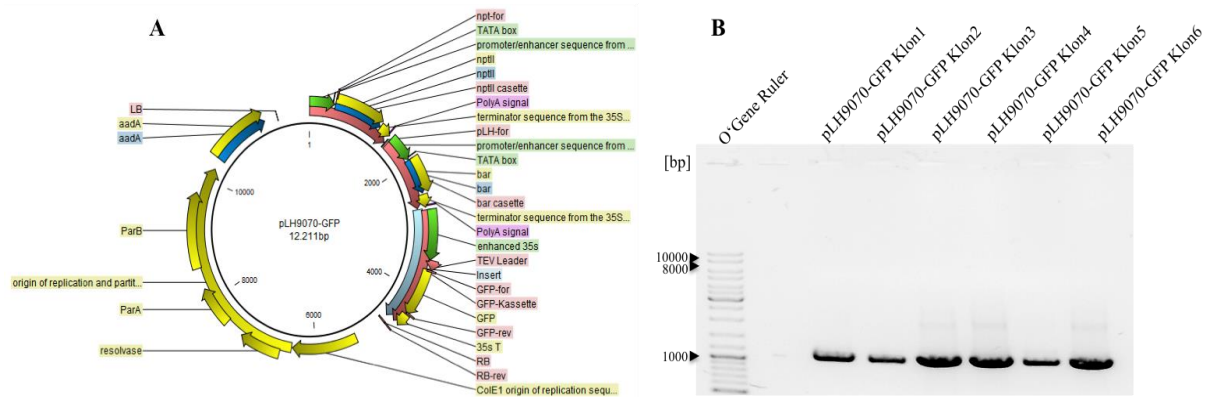
10x T4 DNA Ligase Puffer	2 $\mu$ l
pLH9070 (80ng) ( <i>HindIII</i> , dephos)	8 $\mu$ l
GFP Kassette (90ng) ( <i>HindIII</i> )	9 $\mu$ l
T4 DNA Ligase	1 $\mu$ l

Der Ligationsansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für die Transformation von kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen verwendet.

### **II.2.10.2.1 Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$ und Selektion von positiven Klonen**

Die Transformation von kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen wurde wie in II.2.10.3 beschrieben durchgeführt. Transformierte Zellen erhalten durch pLH9070-*GFP* eine Spectinomycin Resistenz durch die kodierte Spectinomycin-Adenyltransferase (*aadA*). Somit wurden die Zellen des Transformationsansatzes auf LB<sup>Spec+</sup> (100  $\mu$ g/ml) Agarplatten über Nacht angezogen. Resultierende Kolonien wurden wie in II.2.10.1.4 beschrieben in Flüssigmedium mit Antibiotikum überführt und am nächsten Tag wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Zur Kontrolle der Orientierung und Insertion der *GFP*-Kassette wurde eine PCR durchgeführt mit einem *GFP*- und einem pLH9070-spezifischen Oligonukleotid (GFP-for und RB-rev). Bei einer Orientierung des Leserasters von *GFP* im Uhrzeigersinn ist ein

1027bp Fragment bei der Gelelektrophorese zu erwarten (Abbildung 3, B). Der Ansatz und das PCR-Programm entsprechen dem in Abschnitt II.2.5.1 beschriebenen. Als Template diente 1 µl 1 : 10 verdünnte pLH9070-*GFP* Plasmidpräparation. Die PCR lief 35 Zyklen mit einer Annealing Temperatur von 56 °C und 30 sec Synthese. Die PCR Produkte wurden über eine Gelelektrophorese kontrolliert (Abbildung 3, B).



**Abbildung 3:** A Schematische Darstellung von pLH9070-*GFP* mit der *GFP*-Kassette. B Gelelektrophorese der PCR zur Bestimmung der Orientierung der *GFP*-Kassette in pLH9070-*GFP*. Die PCR wurde mit *GFP*-for und *RB*-rev als Oligonukleotide durchgeführt.

In der PCR zeigten alle getesteten pLH9070-*GFP* Klone (1 bis 6) ein Fragment bei 1000 bp (Abbildung 3, B) was die Insertion der *GFP*-Kassette bestätigt.

#### II.2.10.4 Klonieren von R Genen aus *Ren3* für die Transformation in anfällige Rebsorten

Identifizierte R-Gene aus dem analysierten *Ren3* Locus sollten mit nativem Promotor und Terminator in anfällige Rebsorten transformiert werden zum Zweck der funktionellen Analyse.

##### II.2.10.4.1 Amplifikation von R Genen

Für die Amplifikation wurden wie in II.2.4 beschrieben Oligonukleotide erstellt, welche an den 5'-Enden komplementäre Sequenzen zum Zielvektor pLH9070 enthielten. Für den anschließenden Transfer in den Vektor pLH9070 wurde das In-Fusion cloning Kit (Takara) verwendet. Für die Amplifikation der Kandidatengene wurde die Phusion Hifi Polymerase verwendet zusammen mit dem BAC-Klon H25C10 als Template, auf welchem die identifizierten NBS-LRR Kandidatengene kodiert sind (Tabelle 7, 8) (Dissertation Murrat Akkurt, 2004).

**Tabelle 7:** Reaktionsansatz zur Amplifikation der Kandidatengene aus dem Resistenzlokus *Ren3*.

10X HiFi Puffer	2 µl
Oligonukleotid fwd (10 µM)	1 µl
Oligonukleotid rev (10 µM)	1 µl
dNTP's	0,4 µl
DNA (H25C10 50 ng/µl)	2 µl
Polymerase (Phusion HiFi 2 U/µl)	0,2 µl
H <sub>2</sub> O (Nuclease frei)	13,4 µl

**Tabelle 8:** Verwendetes PCR Programm zur Amplifikation der Kandidatengene

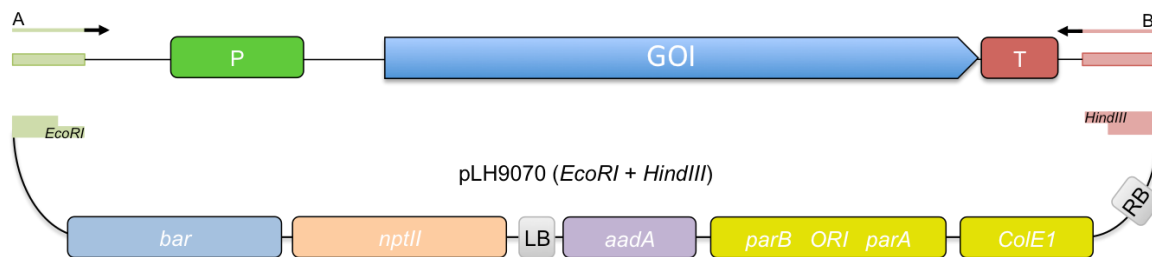
Temperatur	Zeit	
98 °C	30 sec	
98 °C	10 sec	35 Zyklen
62 °C	15 sec	
72 °C	3:30 min	
72 °C	10 min	
12 °C	∞	

Das PCR-Produkt wurde anschließend über eine Gelelektrophorese auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt (MN Gel- and PCR-Clean up).

#### **II.2.10.4.2 In-Fusion Klonierung der R-Gene in pLH9070**

Um die aufgereinigten PCR-Fragmente der Kandidatengene mit nativem Promotor und Terminator in den Pflanzentransformationsvektor pLH9070 zu klonieren, wurde das In-Fusion Cloning Kit (Takara) verwendet. Bei diesem ligaseunabhängigen Klonierungssystem wird das Insert über homologe Sequenzen zum Zielvektor, die durch die Amplifikationsoligonukleotide an die Enden der PCR-Fragmente angehängt wurden am Ende in den Vektor integriert. Da von Seiten des Herstellers keine genauen Angaben zum enthaltenen Enzym gemacht werden kann nur vermutet werden, dass es sich dabei um die Vaccinia Virus DNA polymerase (VAC DNA pol) handelt welche eine 3' – 5' Exonuklease Aktivität besitzt, wodurch an den Enden des Inserts und des Vektors einzelsträngige DNA (ssDNA) gebildet wird. Über diese ssDNA Überhänge und die homologen Sequenzen kann das Insert in den Vektor eingebracht werden (D. Gammon & D. Evans, 2009). Hierfür wurde der Vektor pLH9070-*GFP* mit *EcoRI* und *HindIII* linearisiert, wodurch die *GFP*-Kassette aus dem Vektor entfernt wurde (Abbildung 4). Die verwendeten Oligonukleotide enthielten an den 5'-Enden jeweils die homologen Sequenzen „upstream“ bzw. „downstream“ der Schnittstellen (Abbildung 4, Oligonukleotid A und B).





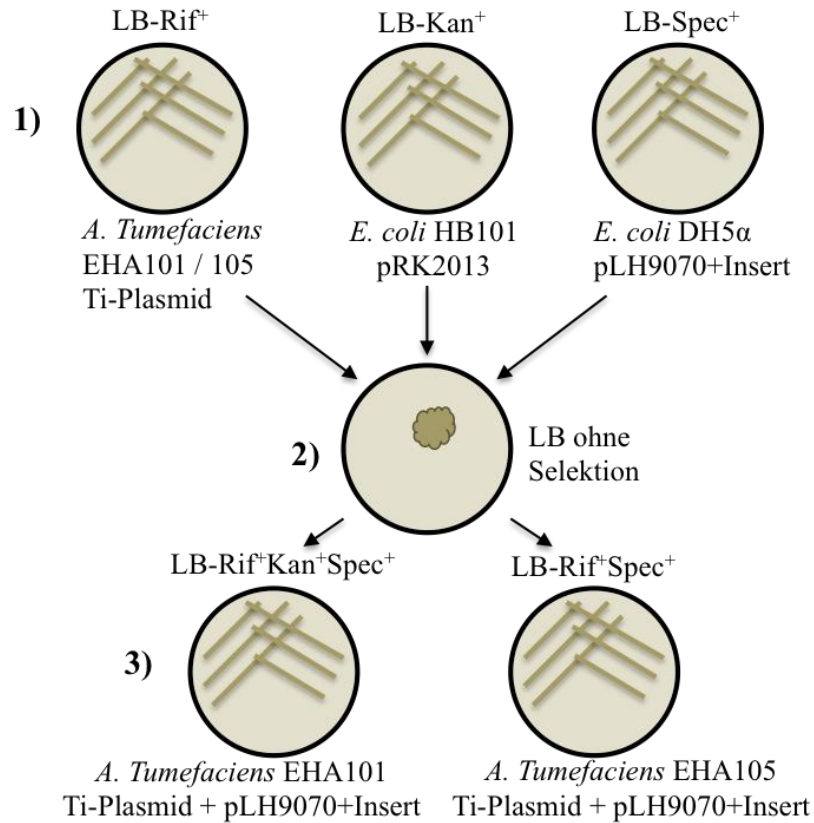
**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Inserts und des linearisierten Vektors, welche für die In-Fusion Klonierung verwendet wurden. (*aadA* = Gen für Spectinomycin Resistenz, *nptII* = Gen für Kanamycin Resistenz, *bar* = Gen für Phosphinothricin Resistenz, LB = Left Boarder, RB = Right Boarder, ColE1 = Origin of Replication *E. coli*, parB ORI parA = Origin of Replication und Partitionierungsfunktionen für *A. tumefaciens*, P = nativer Promotor, T = nativer Terminator, GOI = Gene of Interest)

Die Insertion des Kandidatengens in den Zielvektor pLH9070 (*EcoRI*+*HindIII*) wurde wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben durchgeführt. Für die Transformation wurden ebenfalls die mitgelieferten kompetenten Zellen (*E. coli* Stellar™) verwendet und die Transformation wurde wie beschrieben durchgeführt. Nach der Transformation wurden jeweils 1:100 und 1:5 Verdünnungen sowie der unverdünnte Rest des Transformationsansatzes auf LB<sup>Spec+</sup> Agarplatten ausplattiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C, wurden erhaltene Klone selektiert und in einer 5 ml LB<sup>Spec+</sup> Flüssigkultur bei 37 °C angezogen um am nächsten Tag eine Plasmidpräparation mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) durchzuführen. Die Plasmide wurden anschließend mit geeigneten Restriktionsenzymen auf ihre Richtigkeit überprüft.

### II.2.10.5 Triparentales Mating für die Transformation von *A. tumefaciens*

Plasmide für die Transformation von Reben wurden nach Kontrolle auf ihre Richtigkeit von *E. coli* DH5α bzw. Stellar™ in *A. tumefaciens* EHA101 und EHA105 übertragen. Dafür wurde ein triparentales Mating durchgeführt (Abbildung 5) (Zyprian & Kado, 1990).

Im ersten Schritt werden die jeweiligen Bakterienkulturen auf Selektionsmedium vermehrt (Abbildung 5, 1). Darauf folgt das eigentliche triparentale Mating auf LB-Medium ohne Selektion bei dem die drei Kulturen zusammen auf einem Haufen vermischt werden und für drei Tage bei 28 °C inkubiert werden (Abbildung 5, 2). Am dritten Tag wird ein Vereinzelungsaustrich vom neu zugewachsenen Rand des Matings auf Selektionsagarplatten durchgeführt (Abbildung 5, 3). Dabei wird *A. tumefaciens* EHA101 mit pLH9070+Insert auf LB-Medium mit Rifampicin (100 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) und Spectinomycin (100µg/ml) angezogen da der Stamm EHA101 eine Kanamycin-Resistenz auf dem Ti-Plasmid besitzt.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des triparentalen Matings mit *A. tumefaciens* EHA101/105, *E. coli* HB101 pRK2013 und *E. coli* DH5α pLH9070+Insert.

*A. tumefaciens* EHA105 dagegen wird nur auf LB-Medium mit Rifampicin und Spectinomycin angezogen, da bei diesem Stamm die Kanamycin-Resistenz auf dem Ti-Plasmid durch eine Punktmutation deletiert wurde. Nach zwei Tagen bei 28 °C wurden einzelne Kolonien in Flüssigkultur überführt, bei 28 °C über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert und am nächsten Tag eine Plasmidpräparation durchgeführt. Durch eine PCR auf das pLH9070+Insert Plasmid wurde der Erfolg des triparentalen Matings verifiziert.

### II.2.11 RNA Extraktion

Gesamt RNA (RNA) wurde aus Blattmaterial extrahiert. Dafür wurde, sofern es möglich war, das dritte Blatt der Triebspitze verwendet. Für die Extraktion wurde das Spectrum™ Total RNA kit (Sigma) verwendet. Für die durchgeführten RT-qPCRs wurden *in vitro* Pflanzen verwendet. Hier wurden die obersten drei Blätter für die RNA-Extraktion verwendet. Die Extraktion wurde wie im Protokoll beschrieben durchgeführt. Einzige Ausnahme war die Zugabe des Binde-Puffers. Hier wurden die maximalen 750 µl Puffer zu dem Lysat gegeben. Für RT-qPCR Analysen wurde ein „On Column“ DNaseI Abbau von DNA durchgeführt. Hierfür wurde nach dem ersten Waschschrift mit Waschpuffer-1 100 µl DNaseI Mix auf die

Säule gegeben (2,5 µl DNaseI, 10 µl RDD Puffer, 87,5 µl H<sub>2</sub>O Nuklease frei) und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die folgenden Schritte wurden anschließend wie im Protokoll beschrieben durchgeführt. Es wurde zweimal mit 35 µl Elutionspuffer eluiert. Die RNA Konzentration und Reinheit wurde photometrisch bestimmt.

## II.2.12 Entfernen der Cap Struktur von mRNAs

Für eine erfolgreiche Ligation an das 5'-Ende von mRNAs, wurde gesamt RNA mit Enzymen behandelt, welche das 7-Methylguanosin am 5'-Ende der mRNA entfernen und ein freies Phosphat zurücklassen was eine Ligation eines Linkers mithilfe der T4-RNA-Ligase ermöglicht.

### II.2.12.1 Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP)

Bei der Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) (Epicenter) handelt es sich um eine Phosphodiesterase, welche in der Lage ist, zahlreiche Phosphatbindungen zu spalten. Dazu zählt die 5'-Pyrophosphat Bindung des 7-Methylguanosins der Cap-Struktur. Eine Inkubation von mRNA mit der TAP resultiert somit in einem freien Phosphat am 5'-Ende der RNA, welches mithilfe der T4-RNA-Ligase mit einer freien 3' OH-Gruppe einer Linker-RNA verknüpft werden kann. Der Ansatz für diese Reaktion ist in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9:** Reaktionsansatz zum Entfernen der Cap-Struktur von mRNAs mithilfe des Enzyms TAP.

RNA (2 µg)	x µl
10X TAP Puffer	5 µl
TAP (6 U)	1,1 µl
H <sub>2</sub> O (Nuklease frei)	ad 50 µl

Der Ansatz wurde 1 ½ Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend mit dem RNeasy MinElute Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 12 µl eluiert.

### II.2.12.2 RNA 5'-Pyrophosphohydrolase (RppH)

Bei diesem Enzym handelt es sich um eine bakterielle RNA 5'-Pyrophosphohydrolase, welche in der ursprünglichen Funktion freie Pyrophosphate am 5'-Ende der RNA entfernt und ein Monophosphat zurücklässt. In Kombination mit einem modifizierten Reaktionspuffer (Thermopol Buffer, NEB) ist dieses Enzym ebenso wie auch die TAP in der Lage das 7-Methylguanosin von prozessierten mRNAs zu entfernen. Dieses Enzym wurde als Ersatz für

das nicht mehr hergestellte TAP Enzym verwendet. Der Reaktionsansatz hierfür ist in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10:** Reaktionsansatz zum Entfernen der Cap-Struktur von mRNAs mithilfe des Enzyms RppH.

RNA (1 µg)	x µl
10X Thermopol Puffer	5 µl
RppH (5 U/µl)	5 µl
Ribolock (40 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O (Nuklease frei)	ad 50 µl

Dieser Ansatz wurde zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde die behandelte RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 12 µl eluiert.

### II.2.13 RNA Ligation

Um CR-RT-PCR- und 5'RACE-Analysen von Kandidatengentranskripten durchführen zu können, wurde mithilfe der T4-RNA-Ligase RNA ligiert, bei der zuvor die Cap-Struktur entfernt worden war (Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Ansatz für die Ligation von RNA mithilfe der T4-RNA-Ligase

RNA (1 µg)	12 µl
DMSO	3 µl
BSA (1µg/µl)	3 µl
Ribolock (40U/µl)	1 µl
T4-RNA-Ligase (10U/µl)	1 µl

Der Ligationsansatz wurde bei 16 °C über Nacht im Wasserbad inkubiert. Der Ansatz wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 12 µl eluiert. Die ligierte RNA wurde bei -20 °C gelagert.

### II.2.14 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese von gesamt RNA wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) verwendet.

#### II.2.14.1 cDNA Synthese für RT-PCR

Für RT-PCR Analysen, wurde der im Protokoll beschriebene Master-Mix und das Syntheseprogramm verwendet. Es wurden jeweils 50 ng unbehandelte RNA in cDNA umgeschrieben.

#### II.2.14.2 cDNA Synthese für RT-qPCR

Für RT-qPCR Analysen wurde ein 50 µl Ansatz für die Synthese verwendet (Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Ansatz für die cDNA Synthese für qPCR Analysen.

RNA (250 ng)	x $\mu\text{l}$
10x RT Puffer	5 $\mu\text{l}$
10x RT RHX Primer	5 $\mu\text{l}$
35x dNTP's	2 $\mu\text{l}$
Reverse Transkriptase	2,5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O (Nuklease frei)	ad 50 $\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde wie im Protokoll beschrieben inkubiert und im Anschluss wurden 2  $\mu\text{l}$  je durchgeführter RT-qPCR verwendet.

### II.2.14.3 cDNA Synthese für CR-RT-PCR und 5'RACE

Für CR-RT-PCR- und 5'RACE-Analysen wurde die in II.2.13 beschriebene ligierte RNA in cDNA umgeschrieben (Tabelle 13). Es wurde ebenfalls ein 50  $\mu\text{l}$  Ansatz für die Synthese von cDNA verwendet.

**Tabelle 13:** Ansatz für die cDNA Synthese aus ligierter gesamt RNA.

ligierte RNA (500 ng)	6 $\mu\text{l}$
10x RT Puffer	5 $\mu\text{l}$
10x RHX Primer	5 $\mu\text{l}$
35x dNTP's	2 $\mu\text{l}$
Reverse Transkriptase	2,5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O (Nuklease frei)	29,5 $\mu\text{l}$

Dieser Ansatz von Tabelle 13 wurde wie im Protokoll des Herstellers beschrieben inkubiert und die synthetisierte cDNA wurde direkt für die CR-RT-PCR und 5'RACE Analysen eingesetzt.

### II.2.14.4 cDNA Synthese für 3'RACE

Für 3'RACE Analysen von Kandidatengentranskripten wurde RNA mithilfe eines Poly-(A) Oligonukleotids (II.1.1.3 3'RACE) in cDNA umgeschrieben. An das 5'-Ende dieses Oligonukleotids war eine spezifische Nukleotidsequenz angehängt, welche später in der 3'RACE für die Amplifikation des kompletten 3'Endes verwendet wurde. Bis auf die Änderung des Oligonukleotids wurde die cDNA Synthese wie im Protokoll des Herstellers beschrieben durchgeführt (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems).

### II.2.15 RT-qPCR mit Power SYBR® Green und 7500 Fast Applied Biosystems

Genexpressionsanalysen wurden mithilfe des Power SYBR® Green PCR Master Mixes (Thermo Fischer) und dem Real Time PCR System 7500 Fast durchgeführt. Synthetisierte

cDNA (II.2.13.2) wurde zusammen mit Oligonukleotiden und dem Master Mix wie in Tabelle 14 angeführt gemischt.

**Tabelle 14:** Ansatz und PCR Programm für qPCRs mit Power SYBR® Green auf dem 7500 Fast Applied Biosystems® System.

Ansatz		PCR Programm		
cDNA	2 µl	Temp.	Dauer	Zyklen
2x Power SYBR® MM	10 µl	95 °C	10 min	
Oligonukleotid for (10 pMol)	0,5 µl	95 °C	15 s	} 40
Oligonukleotid rev (10 pMol)	0,5 µl	60 °C	60 s	
H <sub>2</sub> O (Nuklease frei)	7 µl			

Vor der Zusammenstellung des Master Mixes wurde jede Komponente gut durchmischt um eine homogene Verteilung der enthaltenen Substanzen zu gewährleisten. Nach den 40 Zyklen der RT-qPCR wurde eine Schmelzkurven-Analyse der amplifizierten PCR-Fragmente durchgeführt, um sicherzustellen, dass in der PCR-Reaktion nur ein Fragment amplifiziert wurde. Der Ct-Wert der untersuchten Gene wurde automatisch durch die 7500 Fast Software v2.3 bestimmt. Die relative Expression („Foldchange“) der Gene wurde mithilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet (Livak & Schmittgen, 2001). Formel zur Berechnung des „Foldchange“ (FC) für das zu untersuchende Gen (GOI, „Gene of Interest“) relativ zu einem Referenzgen (RF):

$$FC = 2^{-((Ct_{GOI} (behandelt) - Ct_{RF} (behandelt)) - (Ct_{GOI} (Kontrolle) - Ct_{RF} (Kontrolle)))}$$

Formel zur Berechnung des Standardfehlers der technischen Wiederholungen ( $\sigma_n$ , 3 biologische Wiederholungen (B1 bis B3), 2 technische Wiederholungen (tW1 und tW2)):

$$\sigma_n = \frac{\sum_{i=1}^3 \frac{Bi_{tW1} + Bi_{tW2}}{2}}{\sqrt{3}}$$

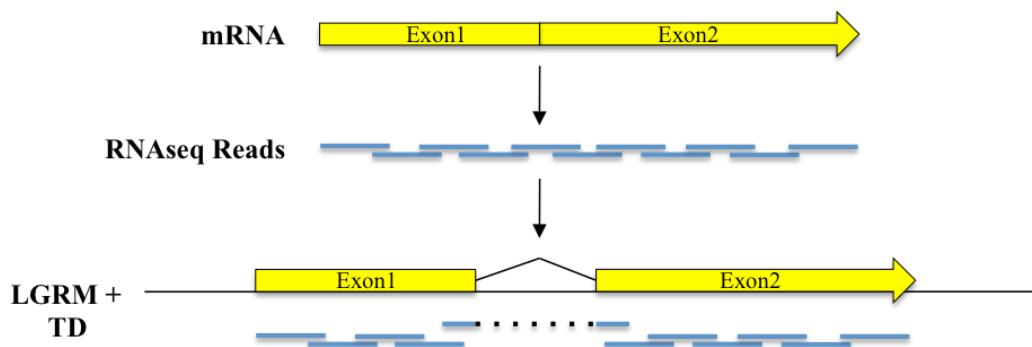
## II.2.16 Analyse von Transkriptenden

Für die Analyse von Transkriptenden wurde ein Large Gap Read Mapping (LGRM) mit Transcript Discovery (TD), eine sogenannte 5' bzw. 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) und eine Circularized Reverse Transcription PCR (CR-RT-PCR) durchgeführt.

### II.2.16.1 Large Gap Read Mapping und Transcript Discovery

Um eine Transkription der untersuchten Kandidatengene nachzuweisen wurde mit RNAseq Daten, welche in einem Projekt zur Analyse der *P. viticola* Resistenzloci *Rpv3* und *Rpv10* erhoben worden sind, verwendet (Dissertation Jens Dudenhöfer, 2016). Die verwendeten RNAseq Daten stammten hierbei von den Individuen 2008-059-020 und 2008-059-121 einer Kreuzungspopulation aus GF.GA-52-42 und 'Solaris'. Es wurde auf die bereits

aufgearbeiteten RNAseq Daten zurückgegriffen. Dabei handelte es sich um Illumina HiSeq 2500 (100 bp paired-end Reads), mit welchen bereits ein Adapter- und Qualitäts-Trimming durchgeführt worden war. Mit dem Modul Large Gap Read Mapping (LGRM), welches in der CLC Genomics Workbench enthalten ist, wurden diese Reads gegen die BAC-Klone H25C10 und B18K14 „gemapped“. Es wurden dabei die RNAseq-Daten vor Inokulation mit *P. viticola* verwendet. Da bei einer RNAseq meist prozessierte mRNAs sequenziert werden, bei denen die Introns herausgespleißt sind, entstehen hier Reads, die nicht vollständig auf das Referenzgenom passen. Mit dem LGRM Modul können diese Reads jedoch im übertragenen Sinn auseinander gezogen werden und somit doch auf die Referenz „gemapped“ werden (Abbildung 6). Hierdurch können Splice Ereignisse dargestellt werden.



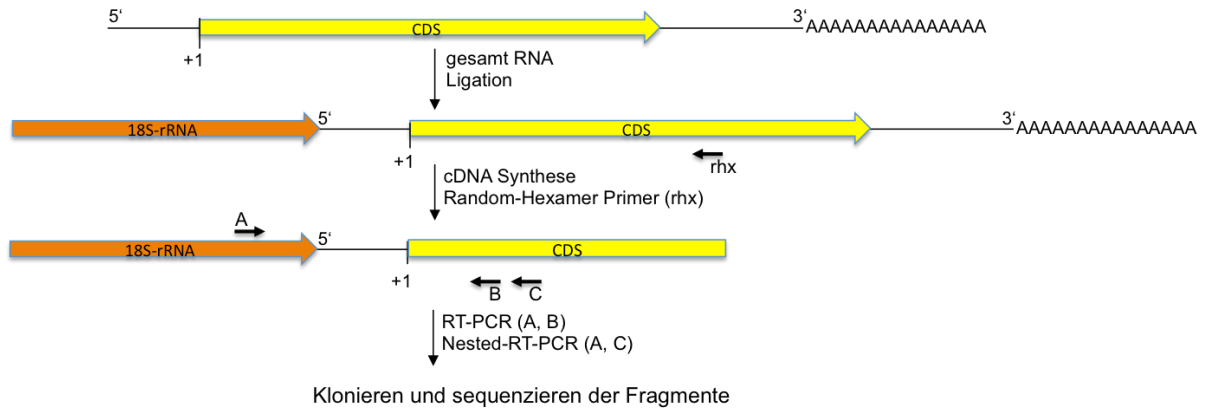
**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des LGRM und der Transcript Discovery (TD) mit RNAseq Daten zur Vorhersage von möglichen Splice Varianten.

Das LGRM wurde mit den empfohlenen Standardeinstellungen durchgeführt. Im Anschluss wurden nur die Reads extrahiert, welche eine 100 % Übereinstimmung mit der Referenz aufwiesen. Auf diese Daten wurde das Modul Transcript Discovery (TD) angewendet um mögliche Transkripte vorherzusagen. Einzige Änderung gegenüber den Standardeinstellungen war hierbei der Punkt „Annotations“ welcher für die durchgeführten Analysen nicht ausgewählt war.

### II.2.16.2 5'RACE

Für die 5'RACE wurde cDNA verwendet, welche aus ligierter gesamt RNA synthetisiert wurde. Hierbei wurde die hohe Abundanz der 18S rRNA genutzt um diese an das 5'-Ende des zu untersuchenden Transkriptes als sogenannten „linker“ zu ligieren. Das chimäre Transkript aus 18S rRNA und dem zu untersuchenden Transkript kann nun mithilfe von „Random

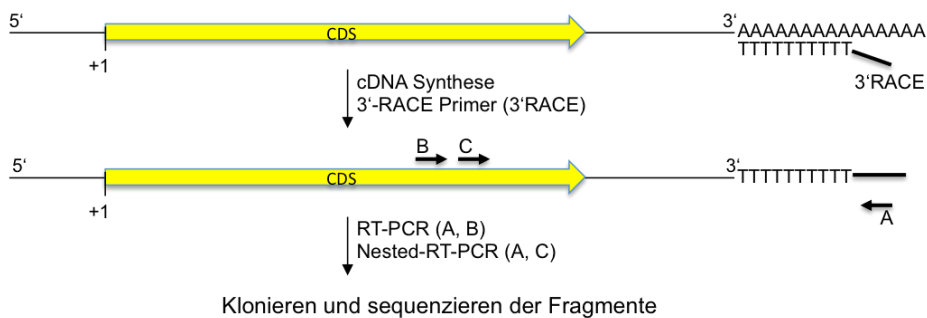
Hexamer“ Oligonukleotiden in cDNA umgeschrieben werden und für RT-PCR und „nested“ RT-PCR Reaktionen verwendet werden (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Schema für die 5'RACE zur Analyse von 5'-Enden von Kandidatengenen. (Coding Sequence (CDS) des Kandidatengentranskripts (gelb); 18S rRNA (orange); "Random Hexamer" Oligonukleotide (rhx); Amplifikationsoligonukleotide für RT-PCR und „nested“ RT-PCR (AC, AB))

### II.2.16.3 3'RACE

Für die Analyse der 3'-Enden von Kandidatengentranskripten wurde eine 3'RACE durchgeführt. cDNAs wurden wie in II.2.13.4 beschrieben mithilfe eines Poly-(T) Oligonukleotids synthetisiert. Die so synthetisierte cDNA konnte im Anschluss für die Amplifikation des 3'-Endes über RT-PCR (Abbildung 8, AB) und „nested“ RT-PCR (Abbildung 8, AC) verwendet werden.

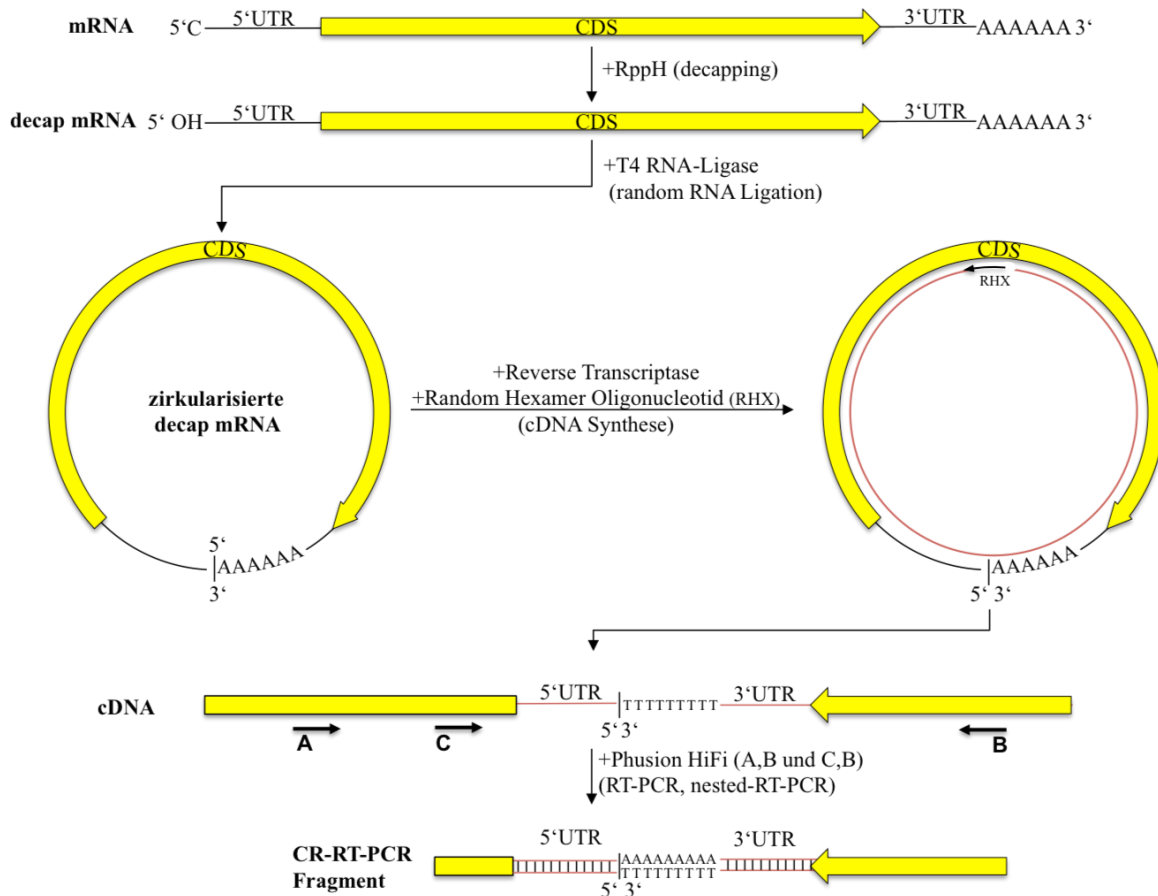


**Abbildung 8:** Schema für die 3'RACE zur Analyse von 3'-Enden von Kandidatengenen. (Coding Sequence (CDS) des Kandidatengentranskripts (gelb); Oligonukleotid für die cDNA Synthese (3'RACE); Amplifikationsoligonukleotid für RT-PCR und „nested“ RT-PCR (AB, AC)).

### II.2.16.4 CR-RT-PCR

Um das 5'- und 3'-Ende von mRNAs gleichzeitig untersuchen zu können wurde eine CR-RT-PCR durchgeführt (Kuhn & Binder, 2002). Hierbei wird das 5'-Ende einer RNA an das 3'-Ende der selbigen ligiert, nachdem bei dieser die Cap-Struktur, wie in II.2.12 beschrieben, entfernt wurde (Abbildung 9).





**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der durchgeführten CR-RT-PCR zur simultanen Analyse von 5'- und 3'-Enden von RNAs. (UTR = untranslated region, CDS = coding sequence, RHX = „Random Hexamer“ Oligonukleotide)

Nach der Ligation der RNA erfolgte eine cDNA Synthese wie in II.2.14.3 beschrieben (Abbildung 9). Mit dieser cDNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Um eine hohe Spezifität der PCR zu gewährleisten wurde mit dem 1:50 verdünnten RT-PCR Ansatz eine nested RT-PCR durchgeführt. Erhaltene nested CR-RT-PCR-Fragmente wurden nach einer Gelelektrophorese (1 % Agarose) aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gel- und PCR-Clean up Kit (Macherey Nagel) aufgereinigt. Aufgereinigte PCR-Fragmente wurden im Anschluss wie in II.2.10 beschrieben in den Vektor pJET1.2/Blunt kloniert und sequenziert.

## II.2.17 amiRNA für Kandidatengen Knock-down

### II.2.17.1 Erstellung von Artificial miRNAs

Für den gezielten Knock-down von Kandidatengen in resistenten Genotypen, wurden mithilfe des „Web microRNA Designer“ (WMD3, MPI, Developmental Biology, Tübingen) artificial microRNAs (amiRNAs) generiert. Die Funktion von miRNAs ist die posttranskriptionelle Regulierung von Transkriptabundanz (Brodersen & Voinnet, 2006). In

*Arabidopsis thaliana* werden miRNAs zuerst als Vorläufermoleküle ohne offenes Leseraster transkribiert (pri-miRNA). Dieses Vorläufermolekül wird mit einer 5'-Cap Struktur und einem Poly-(A) Schwanz versehen. Die pri-miRNA bildet eine sogenannte „Hairpin“ Sekundärstruktur aus deren „Stemloop“ im Anschluss die pre-miRNA (doppelsträngige RNA, dsRNA) mithilfe von DCL1 und HYL1 herausgeschnitten. Diese pre-miRNA (dsRNA) wird nun durch HEN1 an den 3'-Enden methyliert um diese zu stabilisieren. Die stabile miRNA kann entweder im Nukleus verbleiben oder durch das Exportin Homolog HASTY in das Cytoplasma transportiert werden. Die miRNA wird nun in den RISC (RNA induced silencing complex) als „Guide-RNA“ geladen. Der komplementäre Strang der miRNA (miRNA\*) wird im Anschluss abgebaut und die miRNA kann mit der Ziel-RNA einen doppelsträngigen RNA Abschnitt bilden, welcher entweder die Translation blockiert oder einen endonukleolytischen Schnitt der RNA zur Folge hat. Dieser Schnitt führt dazu, dass das 3'-Ende der Ziel-RNA uridiniliert wird und somit durch die Exoribonuklease XRN4 abgebaut wird (Brodersen & Voinnet, 2006).

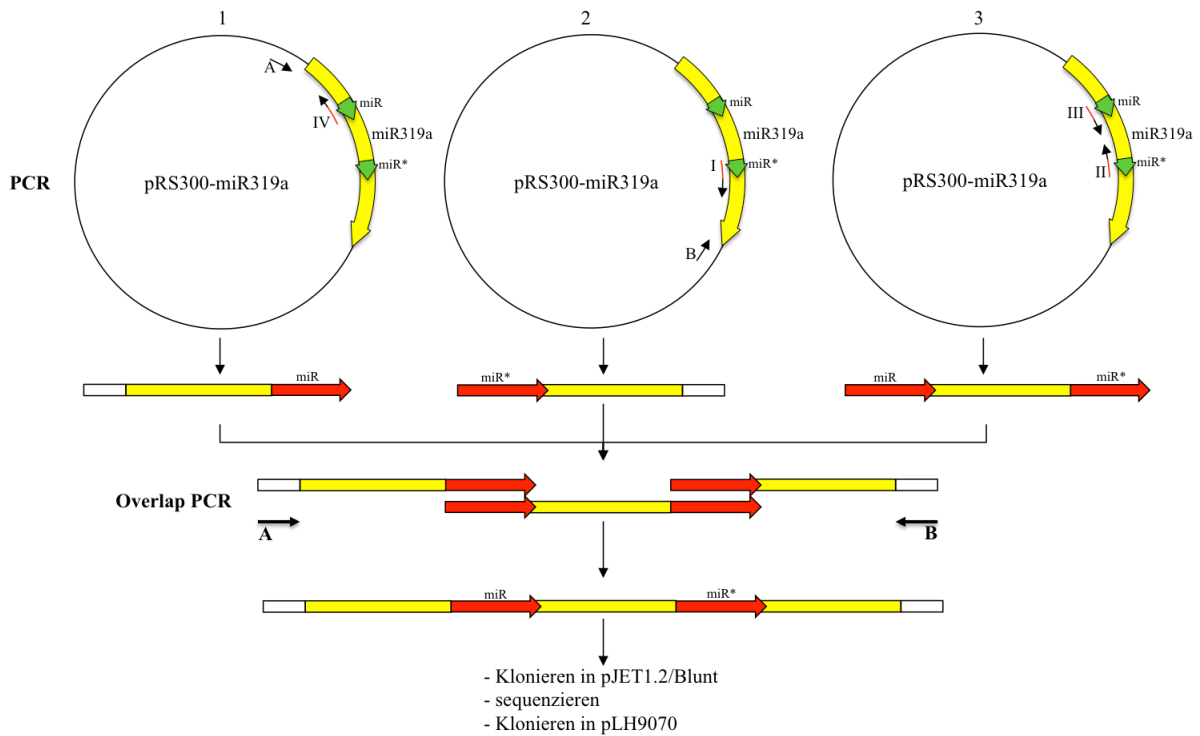
Bei der Generierung von amiRNAs sind folgende Faktoren zu berücksichtigen (WMD3, Help):

- 100 % Übereinstimmung der amiRNA von Nukleotid 2 bis 12 mit der Target Sequenz
- GC Gehalt in der 3'-Region der amiRNA sollte höher sein als in der 5'-Region
- Nukleotid 10 sollte ein Adenin sein
- Ein bis zwei SNPs im 3'-Bereich der amiRNA zur Target Sequenz
- Freie Energie sollte zwischen 35 und 38 kcal/mol liegen
- Der gesamt GC Gehalt sollte 50 % betragen

Mithilfe des WMD3 Designers können diese Kriterien berücksichtigt werden. Um spezifische amiRNAs zu generieren wurde im WMD3 Designer das Target Transkript und die *Vitis vinifera* v143 Phytozome Datenbank angegeben zum Abgleich von möglichen „Off Targets“.

### **II.2.17.2 Amplifikation und Klonierung der erstellten amiRNAs**

Die PCR-basierte Generierung der mithilfe des WMD3 Dienstes erstellten amiRNAs, ist in Abbildung 10 dargestellt. Als Template für die amiRNAs dient die microRNA miR319a, welche in das Plasmid pRS300 kloniert zur Verfügung gestellt wurde (Rebecca Schwab, 2005).



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung zur Generierung von amiRNAs (Protokoll Rebecca Schwab, MPI for Developmental Biology, Tübingen 2005)

Durch den WMD3 Dienst werden vier unterschiedliche Oligonukleotide generiert, welche in einer PCR zur Site-Directed-Mutagenesis genutzt werden. Dadurch werden nur die Guide-RNA (miR und miR\*) Sequenzen modifiziert, damit diese homolog zur gewünschten Target RNA sind. Zusätzlich werden Plasmid-spezifische Oligonukleotide (A und B) verwendet um das gesamte amiRNA-Konstrukt mit der MCS des Plasmids zu amplifizieren (Abbildung 10). Bei der Amplifikation der amiRNA wird das Konstrukt zunächst in drei Teilstücken amplifiziert, wobei jeweils die Sequenz der sense- (Oligonukleotid III und IV; miR) und antisense amiRNA (Oligonukleotid I und II; miR\*) eingefügt wird. Die drei amplifizierten Fragmente besitzen an den Enden Überlappungen (miR und miR\*) worüber sie mit den Oligonukleotiden A und B in einer Overlap-PCR zusammengeführt werden und somit das amiRNA Konstrukt für die Klonierung in den Vektor pJET1.2/Blunt vorbereitet ist (Abbildung 10).

Die generierten amiRNAs wurden anschließend sequenziert und im folgenden Schritt über *SwaI* und *BamHI* in das Plasmid pLH9070 hinter den 35S-Promotor kloniert. Dafür wurde das Plasmid pLH9070-*GFP* verwendet. Durch die Restriktion mit den beiden Endonukleasen *SwaI* (5'...ATTTAAAT...3' / 3'...TAAAJTTA...5') und *BamHI* (5'...GGATCC...3' / 3'...CCTAGG...5') wird die kodierende Sequenz von *GFP* aus dem Plasmid herausgeschnitten wodurch der 35S-Promotor und -Terminator zurückbleiben.

Die sequenzierten amiRNAs wurden mithilfe von *EcoRV* ( $5' \dots \text{GAT}^* \text{ATC} \dots 3'$  /  $3' \dots \text{CTA}^* \text{TAG} \dots 5'$ ) und *BamHI* ( $5' \dots \text{G}^* \text{GATCC} \dots 3'$  /  $3' \dots \text{CCTAGG} \dots 5'$ ) aus dem Vector pJET1.2/Blunt herausgeschnitten. Die Ligation und Selektion erfolgte wie in II.2.10.2.1 beschrieben. Eine Dephosphorylierung des linearisierten Vektors war durch die inkompatiblen Enden nicht nötig. Plasmide von positiven Klonen wurden wie in II.2.10.5 beschrieben durch das triparentale Mating in die Agrobakterien Stämme EHA101 und EHA105 transferiert, welche im Anschluss nach einer Plasmidpräparation mittels PCR mit den Oligonukleotiden RB-Rev und I-miR s auf eine erfolgreiche Transformation getestet wurden.

### II.2.18 Transformation von embryogenen Zellkulturgewebe

Um eine funktionelle Analyse der Kandidatengene aus *Ren3* durchführen zu können, wurde embryogenes Zellkulturgewebe mit den generierten Konstrukten transformiert. Für den Knock-down von *Ren3-1* wurde embryogenes Gewebe von 'Regent' verwendet. Für die Transformation von *Ren3-1* in anfällige Rebsorten wurde Gewebe der Rebsorten 'Chardonnay' und 'Riesling' verwendet. Das embryogene Gewebe wurde dafür zuvor aus Antheren gewonnen. Die einzelnen Schritte der Transformation wurden von der Arbeitsgruppe Gewebekultur unter der Leitung von Dr. Margit Harst durchgeführt.

#### II.2.18.1 Selektion von transgenen in vitro Pflanzen

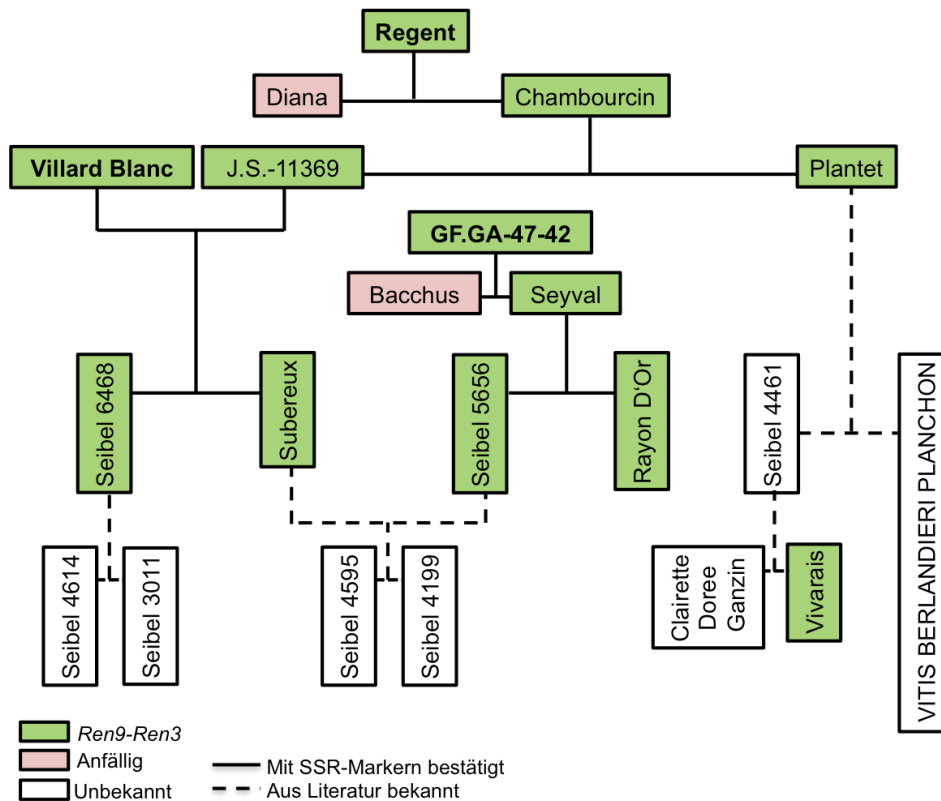
Für die Selektion von regenerierten Keimlingen aus dem mittels Agrobakterien transformiertem embryogenem Gewebe wurde eine Doppelselektion aus Kanamycin und Phosphinothricin gewählt. Diese Selektionsmarker wurden gewählt, da bei erfolgreicher Insertion der T-DNA des pLH9070 Plasmids zusammen mit dem gewünschten Konstrukt die beiden Gene *nptII* (Neomycin-Phosphotransferase) und *bar* (Phosphinothricin-Acetyltransferase) in das Genom der Pflanze integriert werden. Kanamycin ist ein bekanntes Antibiotikum zur Selektion von transformierten Bakterien. Hierbei bindet es in der aktiven Form an die ribosomale RNA und verhindert dadurch die Translation. Bakterien die durch erfolgreiche Transformation den Selektionsmarker *nptII* erhalten haben können Kanamycin phosphorylieren und dadurch inaktivieren. Eine Behandlung von Pflanzen mit Kanamycin resultiert primär somit nicht im Absterben der Pflanzenzellen, sondern der Chloroplasten, welche nach der Endosymbionten-Hypothese eine enge Verwandtschaft zu Bakterien aufweisen (Mcfadden, 1999). Durch das Absterben der Chloroplasten entstehen Chlorosen und schlussendlich geht die Pflanze bedingt durch verminderte Photosynthese Leistung zu Grunde. Phosphinothricin dagegen ist ein Herbizid, welches unter dem Namen Glufosinat kommerziell vertrieben wird und zum Beispiel Bestandteil von Basta® ist. Phosphinothricin

hemmt die Photorespiration der Pflanze, indem es die Glutaminsynthetase inhibiert. Die Glutaminsynthetase fixiert freies  $\text{NH}_3$  welches durch den Glycin-Decarboxylase-Complex (GDC) bei der Synthese von Serin freigesetzt wird. Die dadurch erhöhte  $\text{NH}_3$  Konzentration in den Zellen wirkt toxisch auf diese. Transgene Pflanzen dagegen können durch das *bar*-Gen das aufgenommene Phosphinothricin acetylieren und es somit inaktivieren, was zu einem normalen Wachstum der Pflanze führt. Für die Doppelselektion wurden klassisch die beiden Wirkstoffe in das Vollmedium zugegeben auf welchem die Pflanzen *in vitro* gezogen werden. Dabei wurden Konzentrationen von 100  $\mu\text{g/ml}$  für Kanamycin und 7,5  $\mu\text{g/ml}$  für Phosphinothricin gewählt. Pflanzen, die bei dieser Behandlung einen normalen Wuchs aufwiesen, wurden weiter auf Medium ohne Selektion propagiert und mittels PCR auf eine T-DNA Insertion überprüft.

### III Ergebnisse

#### III.1 Feinkartierung der Resistenzloci *Ren3* und *Ren9* in experimentellen Kreuzungspopulationen

In vorangegangenen Arbeiten zur Charakterisierung der Resistenz von 'Regent' gegen *E. necator* konnte der Resistenzlokus *Ren3* auf Chromosom 15 durch QTL-Analysen in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Lemberger' identifiziert werden (Fischer *et al.*, 2004). Durch weitere Arbeiten an diesem Resistenzlokus wurden enger gekoppelte genetische Marker entwickelt, welche eine hohe Korrelation mit der Resistenz gegen den Echten Mehltau aufwiesen (Akkurt *et al.*, 2006; Welter *et al.*, 2007). Eine Feinkartierung von *Ren3* konnte den Bereich des Resistenzlokus auf ein Intervall von ca. 200 kb eingrenzen und ein zweiter Resistenzlokus, welcher den Namen *Ren9* erhielt, konnte ebenfalls auf Chromosom 15 in 'Regent' identifiziert werden (Schneider und Zyprian, unveröffentlicht; Zandler *et al.*, 2017). In der hier vorgestellten Arbeit wurde, für weitere Analysen der beiden Resistenzloci *Ren3* und *Ren9*, das Chromosom 15 in zwei weiteren experimentellen Kreuzungspopulationen mit SSR-Markern feinkartiert, die eng mit den beiden Resistenzloci assoziiert waren.



**Abbildung 11:** Ausschnitt des Stammbaums von 'Regent', 'Villard Blanc' und GF.GA-47-42 (Röckel, Maul, Hausmann, unveröffentlicht). Durch Literatur beschriebene Verwandtschaften wurden mit gestrichelten Linien dargestellt. Für Verwandtschaften, welche abgesichert sind durch SSR-Marker, wurde eine durchgängige Linie verwendet. Individuen mit *Ren9/Ren3* Allelen wurden grün markiert, anfällige rot und Akzessionen mit unbekanntem Genotyp wurde weiß hinterlegt.

Die Kreuzungseltern dieser Kreuzungspopulationen, 'Regent', GF.GA-47-42 und 'Villard Blanc', weisen, bedingt durch ihre Verwandtschaft *Ren3*- und *Ren9*-assoziierte Allele auf Chromosom 15 auf (Zendler *et al.*, 2017, Hausmann, unveröffentlicht)(Abbildung 11, Tabelle 19). F1-Individuen der untersuchten experimentellen Kreuzungspopulationen von 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' und GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' wurden um 1999 ausgepflanzt und standen bis 2017 auf der Versuchsfläche des JKI Geilweilerhof. Die Kernpopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' wurde 2015 um weitere 1050 F1-Individuen erweitert, welche ebenfalls auf der Versuchsfläche des Instituts gepflanzt sind. Diese können jedoch bedingt durch ihr junges Alter noch nicht auf Resistenz phänotypisiert werden. Für die Kernpopulation wurden in den Jahren 1999, 2000, 2003, 2005 und 2006 phänotypische Daten bezüglich der Resistenz gegen den Echten Mehltau aufgenommen. Die Population 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' wurde 2016 zum ersten Mal bezüglich Resistenz gegen *E. necator* untersucht.

Weiterhin wurden für die Feinkartierung und Eingrenzung des neu beschriebenen Resistenzlokus *Ren9* F1-Individuen aus experimentellen Kreuzungen zur Pyramidisierung der Resistenzloci *Ren3/Ren9* und *Run1* untersucht. Hierbei wurden gezielt Individuen selektiert, welche Rekombinationen auf Chromosom 15 und eine Abwesenheit der *Run1*-assoziierten Allele aufwiesen.

### III.1.1 Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon'

Die experimentelle Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' ist eine aus 252 Individuen bestehende Kreuzung aus dem Jahr 1999 die wurzelecht auf der Versuchsfläche des JKI Geilweilerhof gepflanzt wurde. Jedes F1-Individuum der Kreuzung stand einzeln in einem Abstand von 1,1 bis 1,8 m mit einem jährlichen Einruten-Rebschnitt im Frühjahr. Bei dem Kreuzungselter 'Regent' handelt es sich um eine resistente Neuzüchtung aus dem Jahr 1967, welche durch Introgressionen von amerikanischen Wildreben Resistenz gegen *E. necator* (*Ren3/Ren9* Abbildung 11, Akkurt *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2004; Welter *et al.*, 2007; Zyprian *et al.*, 2016; Zendler *et al.*, 2017) sowie *P. viticola* aufweist (*Rpv3*, Welter *et al.*, 2007). 'Cabernet Sauvignon' dagegen stellt eine traditionelle Rebsorte dar, die einen genetischen *V. vinifera* Hintergrund besitzt und dadurch anfällig bezüglich des Echten und Flaschen Mehltaus ist.

#### III.1.1.1 Resistenzbonitur in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon'

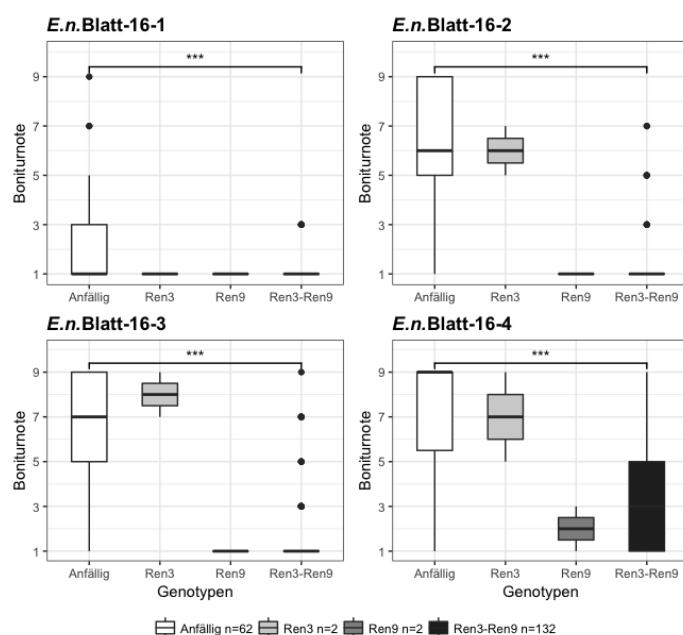
Tabelle 15 zeigt die Verteilung von resistenten und anfälligen F1-Individuen der Kreuzungspopulation. Die Individuen wurden anhand der detektierten Allele eingeordnet.

Etwa ein Viertel der F1-Individuen dieser Population tragen keine der bekannten Resistenz-assoziierten *Ren9*- bzw. *Ren3*-Allele auf Chromosom 15 (Zendler *et al.*, 2017). Eine Kombination aus *Ren9*- und *Ren3*-assoziierten Allelen war bei dreiviertel der F1-Individuen zu detektieren und nur jeweils zwei Individuen wiesen Rekombinationen auf, die dazu führten, dass entweder *Ren3*- oder *Ren9*-assoziierte Allele gefunden wurden (Tabelle 15).

**Tabelle 15:** Verteilung von *Ren3*, *Ren9*, *Ren9/Ren3* und anfällig in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' zusammen mit der medianen Boniturnote der einzelnen phänotypischen Evaluierungen im Jahr 2016.

	n	Median Bonitur			
		<i>E.n. Blatt-2016-1</i>	<i>E.n. Blatt-2016-2</i>	<i>E.n. Blatt-2016-3</i>	<i>E.n. Blatt-2016-4</i>
<b>Anfällig</b>	62	1	6	7	9
<b><i>Ren3</i></b>	2	1	6	8	7
<b><i>Ren9</i></b>	2	1	1	1	2
<b><i>Ren9 Ren3</i></b>	132	1	1	1	3
<b>Total</b>	198	1	1	1	3

Der Median der detektierten Boniturnoten lag bei anfälligen Genotypen zwischen eins und neun bei F1-Individuen mit *Ren9/Ren3* Allelen dagegen zwischen eins und drei (Tabelle 15, Abbildung 12). Abbildung 12 zeigt die Verteilung der erhobenen phänotypischen Daten über die Vegetationsperiode 2016 in Boxplots. F1-Individuen mit *Ren9*-, *Ren3*- und *Ren9/Ren3*-Allelen wurden jeweils gegen anfällige F1-Individuen aufgetragen. Für den ersten Datensatz (*E.n. Blatt* 16.1, Tabelle 15, Abbildung 12) ist zu erkennen, dass, bedingt durch den frühen Zeitpunkt der Erhebung (2016-1 25-06-2016), die vergebenen Boniturnoten für alle Individuen der Kreuzungspopulation in Richtung Note 1 verschoben sind.



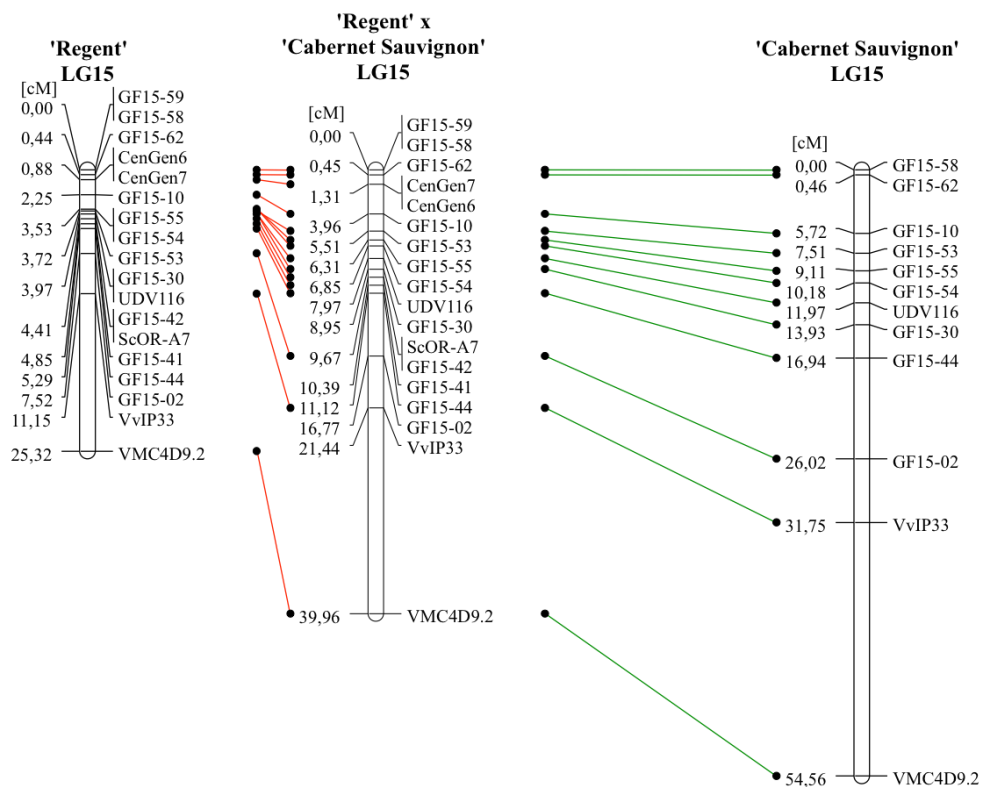
**Abbildung 12:** Verteilung der vergebenen Boniturnoten zu den vier phänotypischen Evaluierungen der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' in der Vegetationsperiode 2016. Es wurden getrennt anfällige und resistente Genotypen pro Zeitpunkt aufgetragen. Signifikante Unterschiede sind im Graphen dargestellt (\*\*\*) =  $P \leq 0.001$ , \*\* =  $P \leq 0.01$ , \* =  $P \leq 0.05$ , NS = nicht signifikant  $P > 0.05$ ).



Für alle untersuchten Datensätze konnte ein signifikanter Unterschied zwischen anfälligen und *Ren3/Ren9*-tragenden Individuen festgestellt werden, welcher jedoch erst bei den Datensätzen **2016-2** (29-07-2016), **-3** (18-08-2016) und **-4** (12-10-2016) deutlich sichtbar wird (Abbildung 12). In der Kreuzungspopulation gab es jeweils zwei F1-Individuen, welche entweder nur *Ren9*- beziehungsweise nur *Ren3*-assoziierte Allele aufwiesen. Die beiden *Ren9*-tragenden Individuen zeigen über die Vegetationsperiode 2016 konstant Boniturnoten zwischen 1 und 3 (Abbildung 12). Die beiden Individuen mit *Ren3*-assoziierten Allelen dagegen zeigen bereits bei der zweiten Bonitur (2016 2 Abbildung 12, Tabelle 15) Infektionen, was dazu führt, dass die Individuen mit fünf bis sieben bewertet wurden.

### III.1.1.2 Genetische Karte für Chromosom 15 von 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon'

Die erhaltenen Allel-Kombinationen der SSR-Marker-Analyse (II.2.6.2) wurden wie in Abschnitt II.2.6.3 beschrieben für JoinMap 4.1 kodiert. Von insgesamt 252 F1-Individuen konnten 229 Individuen für die Berechnung der genetischen Karten verwendet werden. Bei den verworfenen 23 Individuen gab es entweder mehr als 30 % Fehlstellen bei den ausgewerteten genetischen Markern oder es wurden Fremdallele bei der SSR-Marker-Analyse detektiert. In Abbildung 13 wurden die maternale, integrierte und paternale genetische Karte nebeneinander dargestellt.



**Abbildung 13:** Genetische Karten von Chromosom 15 von 'Regent', 'Cabernet Sauvignon' und die integrierte genetische Karte 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' (Zendler *et al.*, 2017). Identische Marker wurden jeweils mit einer Linie miteinander verbunden. Markerabstände sind in Centimorgan [cM] angegeben.

Gleiche Marker der parentalen Karten wurden jeweils mit den Markern der integrierten Karte verbunden (Abbildung 13). Genetische Marker, die dominant für die 'Chambourcin' Haplophase von 'Regent' waren, sind wie zu erwarten, in der paternalen Karte nicht vorhanden. Zu diesen Markern zählen GF15-59, CenGen6, GF15-41, GF15-42 und ScORA7 (Abbildung 13, 'Cabernet Sauvignon'). Die Markerpositionen der berechneten genetischen Karten stimmen mit ihrer physikalischen Lage im Referenzgenom PN40024 12Xv0 (Jaillon *et al.*, 2007) überein. Einzige Ausnahme bilden die Marker GF15-55/GF15-54 und GF15-53 in der genetischen Karte von 'Regent' (Abbildung 13, Regent LG15). Wie in der integrierten und paternalen Karte zu erkennen ist, müsste der Marker GF15-53 vor GF15-55/GF15-54 kartieren was auch seiner physikalischen Lage im Referenzgenom entspräche. Die drei Karten unterscheiden sich ebenfalls in der berechneten genetischen Distanz. Die Karte von 'Cabernet Sauvignon' ist mit 54 cM mehr als doppelt so lang wie die genetische Karte von 'Regent' mit 25 cM. Für die integrierte genetische Karte der Kopplungsgruppe 15 aus 'Regent' und 'Cabernet Sauvignon' wurde eine Länge von 39 cM berechnet. Die Marker GF15-59/GF15-58, CenGen6/CenGen7, GF15-30/UDV116 und GF15-42/ScORA7 wurden in der genetischen Karte von 'Regent' an dieselbe Position gerechnet (Abbildung 13). In der integrierten Karte konnten GF15-30 und UDV116 dagegen getrennt dargestellt werden.

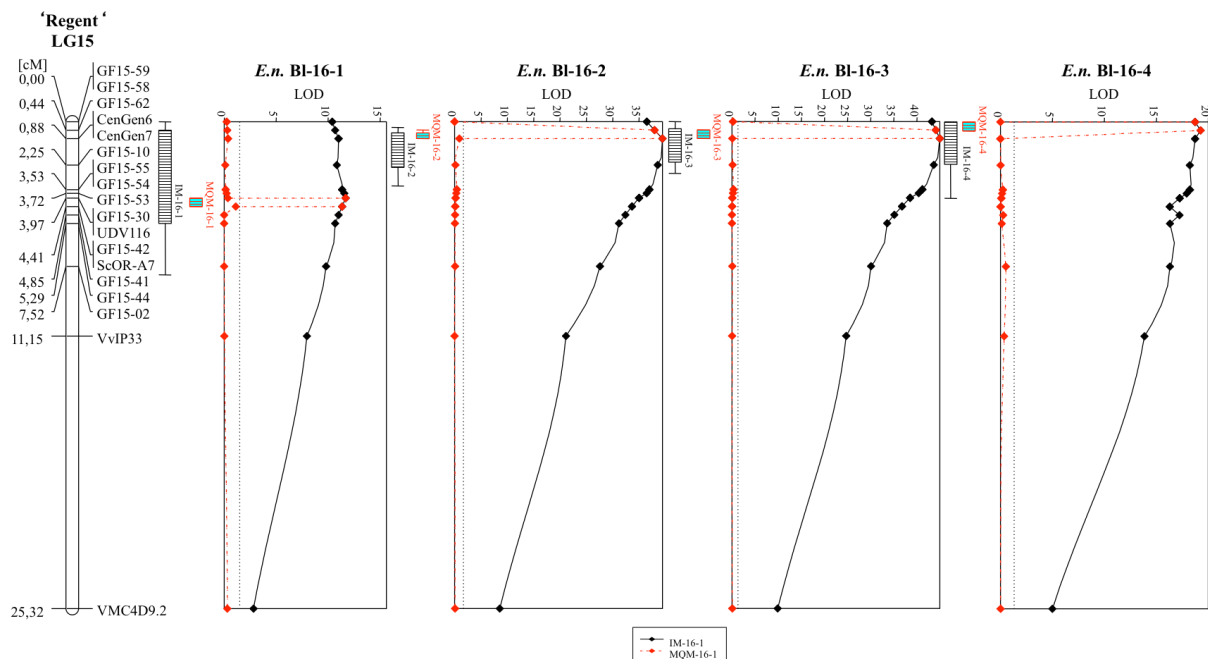
### **III.1.1.3 QTL-Analyse für Resistenz gegen *E. necator* auf Chromosom 15 in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon'**

Für die QTL-Analyse für Resistenz gegen *E. necator* wurden die in III.1.1.1 dargestellten phänotypischen Daten mit den Daten der genetischen Kartierung (III.1.2.1) mithilfe von MapQTL 6.0 verrechnet. Für die Verrechnung wurden die beiden parental Karten von 'Regent' und 'Cabernet Sauvignon' getrennt verrechnet um die Einflüsse der elterlichen Allele darstellen zu können. Die Ergebnisse der QTL-Analyse mit der genetischen Karte von 'Regent' sind in Abbildung 14 gezeigt. Für alle vier durchgeführten Bonituren konnte ein QTL auf Chromosom 15 detektiert werden, welcher zwischen einem LOD-Wert von 12 bis 45 schwankte. Mit der ersten Bonitur, welche früh in der Infektionsphase durchgeführt wurde, konnte ein maximaler LOD-Wert von 12 detektiert werden. Dadurch wurden etwa 23 % der phänotypischen Varianz erklärt (Tabelle 16). Der QTL ist zum mittleren Teil von Chromosom 15 verschoben und sein  $LOD_{max}$  ist mit den Markern GF15-30 und UDV116 assoziiert. Das Konfidenzintervall ( $LOD \pm 1$ ) erstreckt sich über den Bereich GF15-62 bis GF15-44 (Abbildung 14, 4,85 cM). Für das MQM wurde durch die automatische Co Faktor Selektion (ACS) der Marker ScORA7 ausgewählt, wodurch das QTL Interval auf die Marker ScORA7 und UDV116 limitiert werden konnte (0,44 cM) (Abbildung 14, Tabelle 16). Für die

beiden Bonituren *E.n.* Bl-16-2 und -3 wurden LOD-Werte zwischen 39 und 45 erzielt mit einer bis zu 63 % Erklärung der phänotypischen Varianz (Tabelle 16). Der maximal LOD ist bei beiden Verrechnungen assoziiert mit den Markern CenGen6 und CenGen7 und das Konfidenzintervall erstreckt sich bei *E.n.* Bl-16-2 von CenGen6 bis GF15-10 und bei *E.n.* Bl-16-3 von GF15-62 bis CenGen7.

**Tabelle 16:** Ergebnisse der QTL-Analyse in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' für das Jahr 2016 mit der genetischen Karte von 'Regent'. Für die vier durchgeführten Bonituren sind die Ergebnisse des IM und MQM mit MapQTL 6.0 aufgelistet.

	Bonitur	Mapping	LOD <sub>max</sub>	% Expl.	nächstgelegener	QTL Intervall	LG15 LOD
					Marker	(LOD <sub>max</sub> ±1)	p≤0,05
'Regent' LG15	E.n. Bl-16-1	IM	11,96	23,1	GF15-30/UDV116	GF15-62 - GF15-44	1,3
		MQM	11,96	23,1	UDV116	UDV116 - ScORA7	
	E.n. Bl-16-2	IM	39,47	58,6	CenGen6/CenGen7	CenGen6 - GF15-10	1,2
		MQM	39,47	58,6	CenGen6	GF15-62 - CenGen6	
	E.n. Bl-16-3	IM	44,96	63,8	CenGen6/CenGen7	GF15-62 - CenGen7	1,3
		MQM	44,96	63,8	CenGen6	GF15-62 - CenGen6	
	E.n. Bl-16-4	IM	19,25	34,7	GF15-62	GF15-59 - GF15-54	1,2
		MQM	19,25	34,7	GF15-62	GF15-58 - GF15-62	



**Abbildung 14:** QTL-Analyse für Resistenz gegen *E. necator* in der Vegetationsperiode 2016 in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon'. Links ist die genetische Karte von Chromosom 15 der 'Regent' Haplophase dargestellt. In die LOD Graphen wurde IM und MQM aufgetragen. Das Konfidenzintervall  $LOD_{max} \pm 1$  ist durch einen Kasten und  $LOD_{max} \pm 2$  durch Whisker links neben dem Graphen markiert.

Durch die ACS wurde CenGen6 als Co-Faktor für die MQM-Analyse ausgewählt. Dadurch konnte der QTL-Bereich jeweils auf GF15-62 bis CenGen6 eingegrenzt werden was einem Bereich von 0,44 cM entspricht (Abbildung 14, Tabelle 16). Der maximale LOD-Wert der

letzten Bonitur (*E.n.*Bl-16-4) liegt bei 20 und erklärt 34 % der phänotypischen Varianz. Der  $LOD_{max}$ -assoziierte Marker ist in diesem Fall GF15-62 und das Konfidenzintervall erstreckt sich von GF15-59 bis GF15-54 was in etwa 3,5 cM entspricht. Durch ACS und MQM konnte der QTL-Bereich auf die Marker GF15-58 bis GF15-62 eingegrenzt werden (0,44 cM) (Abbildung 14, Tabelle 16).

Alles in allem zeigen die Bonituren eine Verschiebung des  $LOD_{max}$  vom Mittelteil zum Anfang von Chromosom 15. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit denen für die Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Lemberger' und für 'Regent' x 'Red Globe' in der der Haupt-QTL ebenfalls mit CenGen6 assoziiert war (van Heerden *et al.*, 2014; Zandler *et al.*, 2017). Dieselbe QTL-Analyse wurde ebenfalls mit der genetischen Karte von 'Cabernet Sauvignon' durchgeführt. Für die Bonituren *E.n.*Bl-16-1 und -4 zeigt kein Marker einen LOD-Wert, welcher die Signifikanzgrenze des Permutationstests überschritten hätte. Bedingt durch die geringe Signifikanzgrenze für die Bonituren 16-2 und -3 ( $LOD_{p<0,05}$  1,4) konnte ein QTL mit  $LOD_{max}$  von 2,3 (*E.n.*Bl-16-2) und 3,2 (*E.n.*Bl-16-3) festgestellt werden (Tabelle 17, Abbildung 60).

**Tabelle 17:** Ergebnisse der QTL-Analyse in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' für das Jahr 2016 mit der genetischen Karte von 'Cabernet Sauvignon'. Für die vier durchgeführten Bonituren sind die Ergebnisse des IM und MQM mit MapQTL 6.0 aufgelistet.

Bonitur	Mapping	$LOD_{max}$	% Expl.	nächstgelegener Marker	QTL Intervall ( $LOD_{max} \pm 1$ )	LG15 LOD $p \leq 0,05$	
'Cabernet Sauvignon' 16-15	E.n. Bl-16-1	IM	n.s.	n.s.		1,3	
		MQM					
	E.n. Bl-16-2	IM	2,3	5	UDV116	GF15-53 – GF15-44	1,4
		MQM	2,3	5	UDV116	GF15-54 – UDV116	
	E.n. Bl-16-3	IM	3,2	6,9	UDV116	GF15-58 – GF15-30	1,4
		MQM	3,2	6,9	UDV116	GF15-54 – UDV116	
	E.n. Bl-16-4	IM	n.s.	n.s.			1,5
		MQM					

### III.1.2 Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc'

Für die Berechnung einer genetischen Karte zur Feinkartierung von Chromosom 15 in der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' wurden die F1-Individuen der beschriebenen Kernpopulation (III.1) verwendet. Hierbei handelt es sich um insgesamt 151 F1-Individuen die seit 1999 wurzelecht in der Parzelle 13 des JKI Geilweilerhofs standen. Die beiden Kreuzungseltern besitzen beide bedingt durch Introgression von amerikanischen Wildreben die Resistenzen *Ren3* und *Ren9* (Abbildung 11). Bei einer Kreuzung der beiden Genotypen sollten somit dreiviertel der F1-Individuen ebenfalls Resistenz-assoziierten Allele aufweisen.

### III.1.2.1 Resistenzbonitur in der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc'

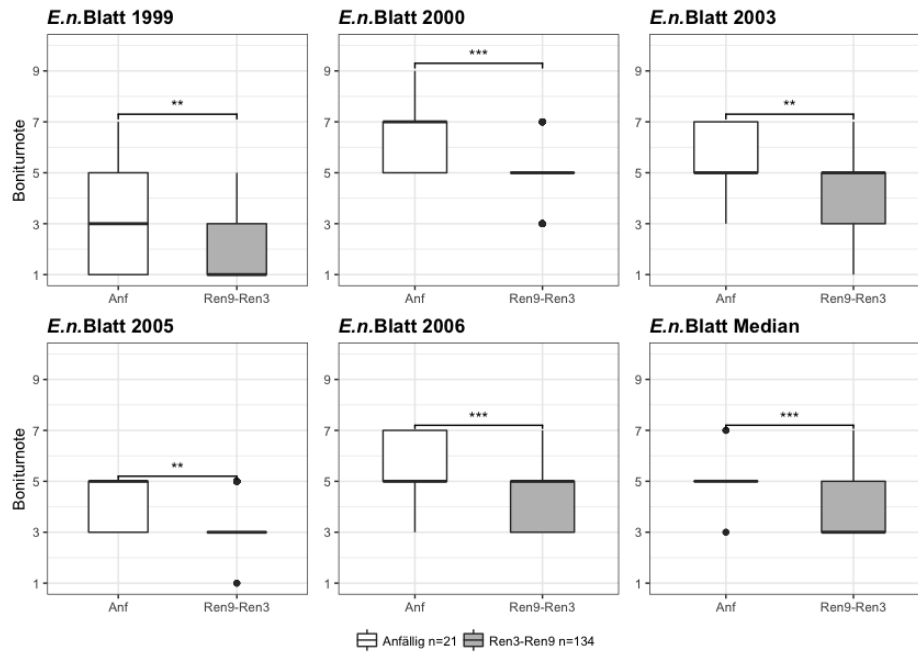
Resistenzbonituren für diese Kreuzungspopulation waren bereits vorhanden und wurden von der Arbeitsgruppe Rebenzüchtung zur Verfügung gestellt. Diese Bonituren wurden jeweils einmal im Jahr am Ende der Vegetationsperiode in der Phase des höchsten Infektionsdrucks durchgeführt (Zeitraum: Ende September bis Anfang Oktober). Diese Daten wurden bereits in anderen Arbeiten für QTL-Analysen verwendet (Zyprian *et al.*, 2016).

**Tabelle 18:** Übersicht der median Boniturnoten der Population und für Individuen jeweils mit Resistenz-assoziierten *Ren9/Ren3*-Allelen und ohne. Für die Auswertung wurden nur Individuen verwendet, für welche in allen fünf Jahren Resistenzbonituren durchgeführt wurden (n=134).

	n	Median Bonitur				
		<i>E.n. BI-99</i>	<i>E.n. BI-00</i>	<i>E.n. BI-03</i>	<i>E.n. BI-05</i>	<i>E.n. BI-06</i>
<b>Anfällig</b>	21	3	7	5	5	5
<b><i>Ren9/Ren3</i></b>	113	1	5	5	3	5
<b>Total</b>	134	1	5	5	3	5

Für die Auswertung der Boniturdaten wurde wie schon zuvor für 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' der Median der vergebenen Boniturnoten für alle resistenten beziehungsweise alle anfälligen F1-Individuen berechnet. Ein deutlicher Unterschied wie bei 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' war hier nicht erkennbar (Tabelle 15, Tabelle 18). Der Median bei anfälligen Individuen lag zwischen drei bis sieben und bei Individuen mit Resistenz-assoziierten Allelen lag dieser Wert zwischen eins und fünf (Tabelle 18). Individuen mit entweder *Ren9*- oder *Ren3*-Allelen waren in dieser Population leider nicht verfügbar. Wie erwartet, ist in dieser Population eine Ungleichverteilung der F1-Individuen festzustellen, was wie bereits erwähnt daran liegt, dass beide Eltern heterozygote *Ren3/Ren9*-Träger sind (Tabelle 19).

Um zu testen, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen resistenten und anfälligen F1-Individuen gab, wurde ebenfalls ein Paardifferenztest mit den erhobenen Boniturnoten durchgeführt. Für alle untersuchten Bonituren konnte ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$  bis  $0,05$ ) detektiert werden (Abbildung 15). Für das Jahr 2003 war der Unterschied zwischen resistent und anfällig jedoch weitaus geringer als in den Jahren 1999, 2000, 2005 und 2006 (Abbildung 15). Im Jahr 1999 ist die Verteilung in Richtung der Note 1 verschoben. Eine klare Unterscheidung von resistenten und anfälligen Individuen so wie es für 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' bei den Bonituren 2016-3 und -4 zu sehen war, war hier nicht möglich (Abbildung 12, Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Verteilung der vergebenen Boniturnoten zu den fünf phänotypischen Evaluierungen der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' in den Vegetationsperioden 1999, 2000, 2003, 2005 und 2006. Es wurden getrennt anfällige und resistente F1-Individuen pro Bonitur aufgetragen. Signifikante Unterschiede sind im Graphen dargestellt (\*\*\* =  $P \leq 0.001$ , \*\* =  $P \leq 0.01$ , \* =  $P \leq 0.05$ , NS = nicht signifikant  $P > 0.05$ ).

### III.1.2.2 Genetische Karte für Chromosom 15 von GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc'

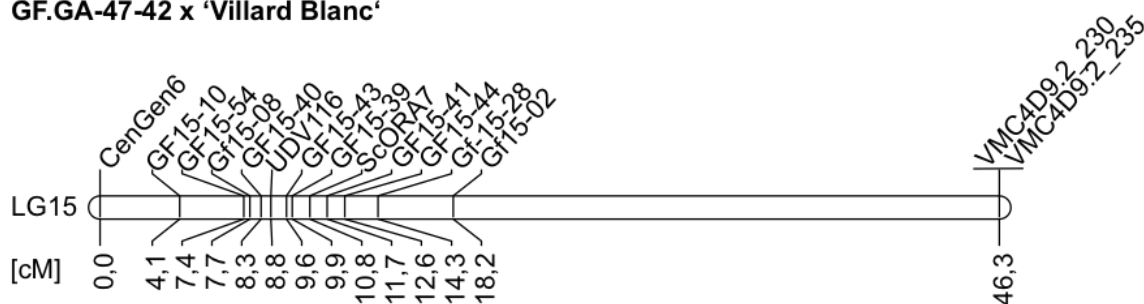
Die erhaltenen Allel-Kombination der durchgeführten SSR-Marker-Analyse sind in Tabelle 19 für die Eltern der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' aufgeführt.

**Tabelle 19:** Allel-Größen in Basenpaaren der ausgewerteten SSR-Marker in der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc'. Resistenz-assoziierte Allele sind kursiv geschrieben.

Marker	Referenz	Position Chr. 15 PN40024 12x [Mb]	GF.GA-47-42		'Villard Blanc'	
			'Bachus' ♀	'Seyval' ♂	Seibel6468 ♀	'Subereux' ♂
CenGen6	van Heerden <i>et al.</i> , 2014	1,4	277	<b>286</b>	275	<b>286</b>
GF15-10	Schwander <i>et al.</i> , unveröffentlicht	2,2	206	-	270	-
GF15-08	Fechter <i>et al.</i> , unveröffentlicht	2,9	283	-	270	-
GF15-54	Zendler <i>et al.</i> , 2017	3,8	246	<b>291</b>	352	<b>291</b>
GF15-43	Schneider <i>et al.</i> , unveröffentlicht	6,3	219	216	216	219
UDV116	Di Gaspero <i>et al.</i> 2005	6,5	152	144	152	144
GF15-40	Zendler <i>et al.</i> , 2017	n.a.	174	131	131	174
GF15-39	Zendler <i>et al.</i> , 2017	7,0	194	<b>210</b>	194	<b>210</b>
ScORA7	Akkurt <i>et al.</i> , 2006	9,4	-	<b>347</b>	<b>347</b>	<b>347</b>
GF14-41	Zendler <i>et al.</i> , 2017	9,6	260	264	257	264
GF15-44	Zendler <i>et al.</i> , 2017	9,9	383	419	385	419
GF15-28	Zyprian <i>et al.</i> , 2016	10,1	375	342	375	342
GF15-02	Fechter <i>et al.</i> , unveröffentlicht	11,6	127	117	127	117
VMC4D9.2	Grando 2004 Vitis Microsatellite Consortium	16,6	240	240	230	235

Die erhaltenen Allel-Kombination der F1-Individuen der Kreuzungspopulation wurden wie in II.2.7 beschrieben für JoinMap kodiert und mithilfe des ML-mappings wurde die integrierte genetische Karte berechnet. Für die Berechnung wurden 143 der insgesamt 151 Individuen verwendet. Die acht verworfenen Individuen hatten entweder mehr als 30 % Fehlstellen bei den untersuchten SSR-Markern, wiesen Fremadallele auf oder waren Selbstungen. Die parental genetical Karten wurden nicht berechnet da hier von beiden Elternteilen bekanntermaßen jeweils Resistenz-assoziierte Allele weitergegeben werden (Abbildung 11, Tabelle 19).

#### GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc'



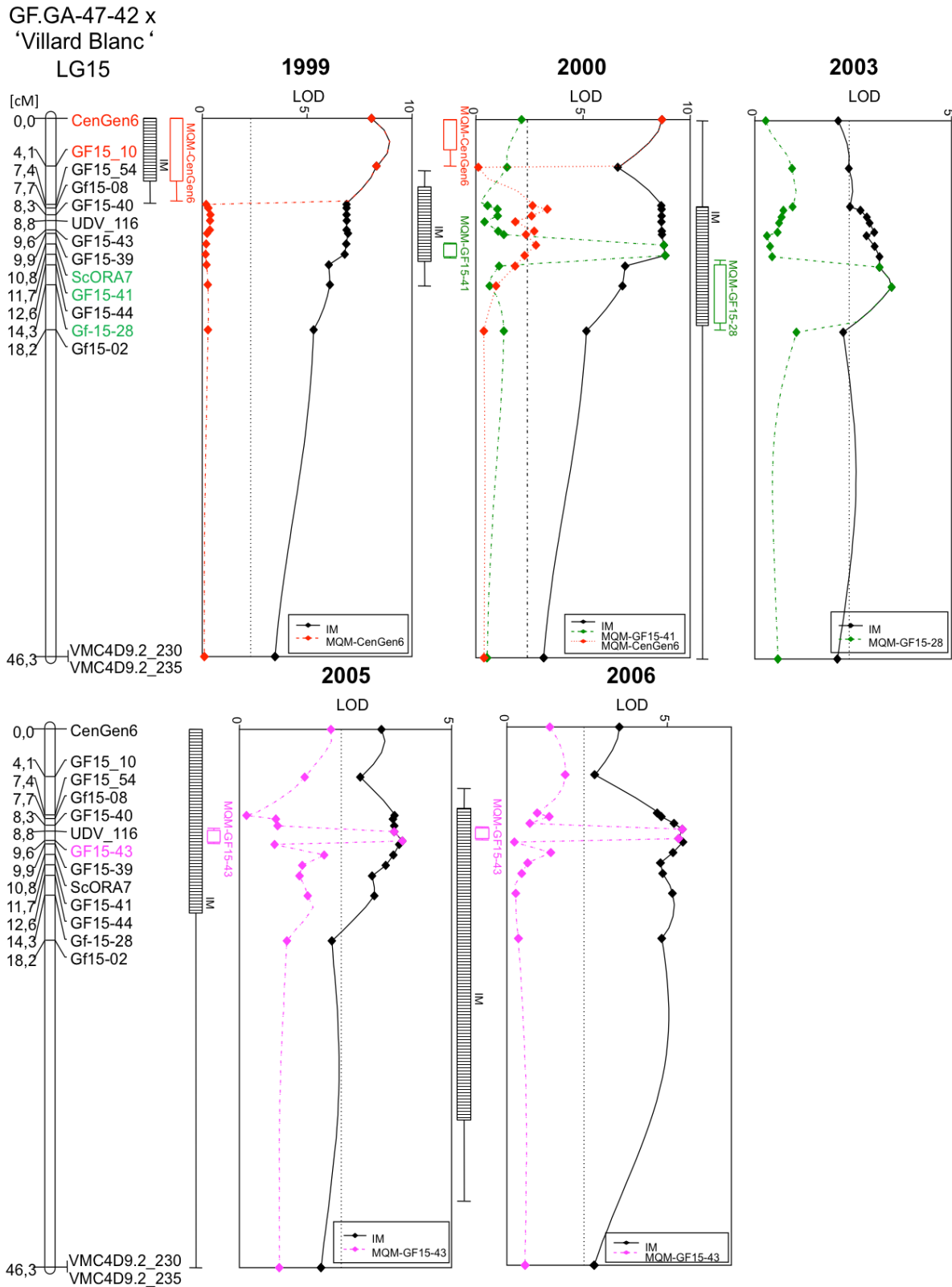
**Abbildung 16:** Darstellung der berechneten integrierten genetischen Karte für Chromosom 15 der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc'. Markerpositionen sind in Centimorgan [cM] angegeben.

Die berechnete integrierte genetische Karte von Chromosom 15 umfasst eine Länge von 46,3 cM und ist somit ca. 6 cM bzw. 8 cM länger als die von 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' (Abbildung 16) und die von 'Regent' x 'Lemberger' (Zendler *et al.*, 2017). Die Markerpositionen stimmen mit ihrer physikalischen Position im Referenzgenom PN40024 12Xv0 überein (Abbildung 16, Tabelle 19).

### III.1.2.3 QTL-Analyse für Resistenz gegen *E. necator* auf Chromosom 15 in der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc'

Die QTL-Analyse für Resistenz gegen den Echten Mehltau wurde mit den in III.1.2.1 beschriebenen Boniturdaten durchgeführt. Diese Daten wurden bereits in anderen Arbeiten erfolgreich für die QTL-Analyse für Resistenz gegen den Echten Mehltau verwendet (Zyprian *et al.*, 2016). In der hier vorgestellten Arbeit sollten die Daten mit einer genetischen Karte mit SSR-Markern, die eng mit den bekannten Resistenzloci *Ren3* und *Ren9* gekoppelt sind, analysiert werden, um die Ergebnisse zu reproduzieren und die Bereiche der Loci nach Möglichkeit weiter einzugrenzen. Für alle verwendeten Datensätze (Jahre: 99, 00, 03, 05 und 06) konnten QTLs für Resistenz gegen den Echten Mehltau auf Chromosom 15 detektiert werden (Abbildung 17, Tabelle 20). Dabei lieferten die Daten der Jahre 1999 und 2000 die besten Ergebnisse bei der QTL-Analyse. Der  $LOD_{max}$  liegt zwischen 8 und 9 für die beiden Jahre und erklärt bis zu 25,2 % der phänotypischen Varianz (Abbildung 17, Tabelle 20). Im

Jahr 1999 begrenzt sich das Konfidenzintervall ( $LOD_{max} \pm 1$ ) auf den Bereich CenGen6 bis GF15-10 was ebenfalls in der MQM-Analyse bestätigt wurde (Abbildung 17, Tabelle 20).



**Abbildung 17:** Ergebnisse der QTL-Analysen der mit der neuen genetischen Karte und den Boniturdaten der Jahre 1999, 2000, 2003, 2005 und 2006. Ergebnisse des IM wurden jeweils in einer durchgezogenen schwarzen Linie angegeben. MQM-Analysen sind in gestrichelten Linien angeben.



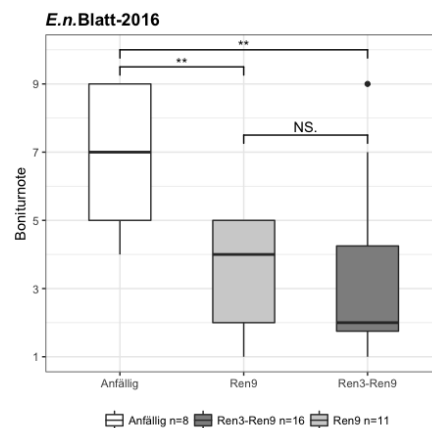
Im Jahr 2000 ist der  $LOD_{max}$  bei der IM Analyse assoziiert mit dem Marker GF15-41 (Abbildung 17,  $LOD_{max}$  8,84). In diesem Jahr gab es ein zweites Maximum im QTL-Graphen, welches, wie im Vorjahr, mit dem Marker CenGen6 assoziiert ist (Abbildung 17, Tabelle 20). Bei der MQM-Analyse mit unterschiedlichen Co-Faktoren konnte der Bereich zum einen auf ein Intervall von ScORA7 - GF15-41 (Tabelle 20, Co-Faktor GF15-41) und zum anderen auf CenGen6 (Tabelle 20, Co-Faktor CenGen6) eingegrenzt werden. Bei der Wahl von CenGen6 als Co-Faktor sind noch zwei weitere QTLs erkennbar, die über die Signifikanzgrenze reichen. Das Intervall der beiden ist jeweils GF15-54 – GF15-40 und GF15-43 – ScORA7 (Tabelle 20). Die QTL-Analyse mit den Daten aus dem Jahr 2003 lieferte mit der publizierten genetischen Karte von Chromosom 15 von GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' keinen QTL. Stattdessen war ein QTL auf Chromosom 18 feststellbar (*Ren8*, Zyprian *et al.*, 2016). Mit der neuen genetischen Karte für Chromosom 15 ist ein QTL mit einem  $LOD_{max}$  von 3,5 nachweisbar der etwa 11,7 % der phänotypischen Varianz erklärt (Abbildung 17, Tabelle 20). Der  $LOD_{max}$  ist jedoch assoziiert mit dem Marker GF15-28 und somit hinter den bekannten *Ren3* Locus verschoben (Abbildung 17, Tabelle 20). In den folgenden Jahren (2005 und 2006) ist ein LOD von 3,8 und 5,4 feststellbar, der 2005 mit GF15-43 und 2006 mit GF15-39 assoziiert ist (Abbildung 17). Die MQM-Analyse mit GF15-43 als Co-Faktor begrenzte das Intervall jeweils auf UDV116 bis GF15-43 (Abbildung 17, Tabelle 20) und erklärt 12,8 und 17,7 % der phänotypischen Varianz (Tabelle 20). Durch diese Untersuchungen konnten somit drei Bereiche auf Chromosom 15 mit Resistenz gegen den Echten Mehltau assoziiert werden wobei es sich bei zwei von den drei um die bekannten Loci *Ren3* und *Ren9* handelt.

**Tabelle 20:** Ergebnisse der QTL-Analysen mit der integrierten genetischen Karte von GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' und den Boniturdaten aus den Jahren 1999, 2000, 2003, 2005 und 2006. Es sind jeweils die Ergebnisse des IM und MQM angegeben.

Bonitur	Mapping	$LOD_{max}$	% Expl.	MQM Co Faktor	nächstgelegener Marker $LOD_{max}$	QTL-Intervall ( $LOD_{max} \pm 1$ )	LG15 LOD $p \leq 0,05$
<b>1999</b>	IM	8,93	23,3		CenGen6/GF15-10	CenGen6 - GF15-10	2,4
	MQM	8,93	23,3	GF15-10	CenGen6/GF15-10	CenGen6 - GF15-10	
<b>2000</b>	IM	8,84	24,9		GF15-41	CenGen6 u. GF15-54 – GF15-41	2,4
	MQM	8,69	24,9	CenGen6	CenGen6	CenGen6	
		3,34	7,8		GF15-08	GF15-54 – GF15-40	
		2,8	6,6		ScORA7	GF15-43 – ScORA7	
MQM	8,84	25,2	GF15-41	GF15-41	ScORA7 – GF15-41		
<b>2003</b>	IM	3,48	11,7		GF15-28	GF15-10 – GF15-28	2,4
	MQM	3,48	11,7	GF15-28	GF15-28	GF15-44 – GF15-08	
<b>2005</b>	IM	3,84	12,8		GF15-43	CenGen6 – GF15-28	2,4
	MQM	3,84	12,8	GF15-43	GF15-43	UDV116 – GF15-43	
<b>2006</b>	IM	5,49	17,8		GF15-39	GF15-54 – GF15-44	2,4
	MQM	5,36	17,7	GF15-43	UDV116	UDV116 – GF15-43	

### III.2 Eingrenzung des Resistenzlokus *Ren9* durch Analyse von rekombinanten F1-Individuen aus weiteren experimentellen Kreuzungen

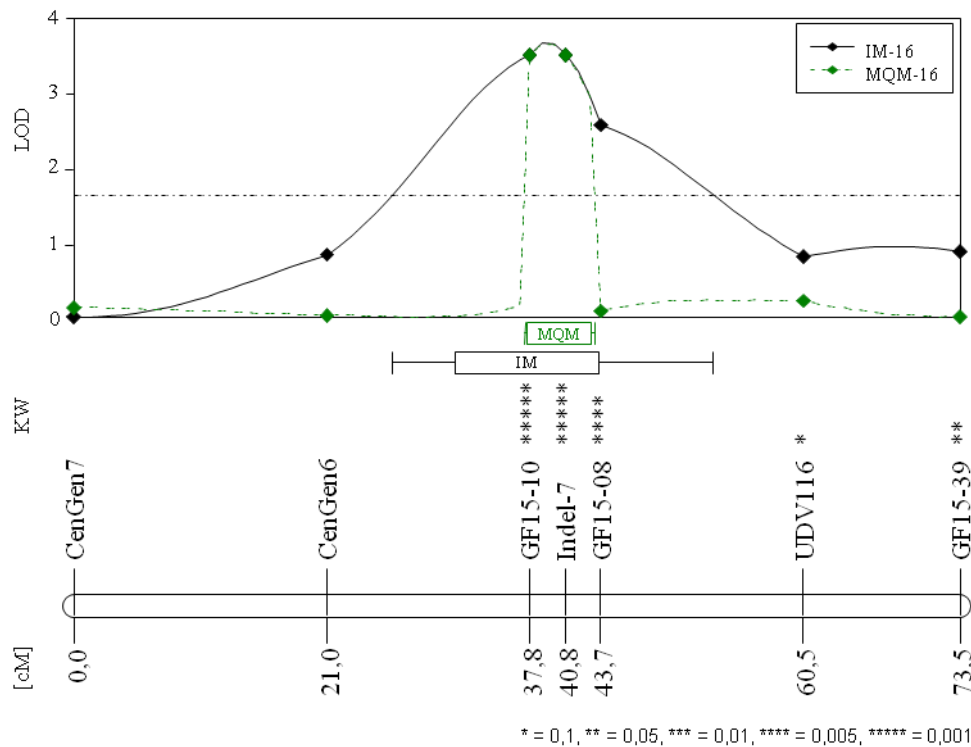
Für die weitere Eingrenzung des Resistenzlokus *Ren9*, der zuerst in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Lemberger' beschrieben wurde (Zendler *et al.*, 2017), wurden F1-Individuen aus anderen experimentellen Kreuzungen mit *Ren9/Ren3*- und *Run1*-tragenden Individuen gezielt auf Abwesenheit von *Run1* und Rekombinationen auf Chromosom 15 untersucht. Dabei wurden 35 F1-Individuen identifiziert, bei denen nach genauerer Untersuchung gezeigt werden konnte, dass 16 Individuen *Ren3*- und *Ren9*-Allele trugen, 11 nur *Ren9*-assoziierte Allele und 8 zeigten keine Resistenz-assoziierten Allele (Abbildung 18). Die mediane vergebene Boniturnote für *Ren9/Ren3* lag bei 2, bei F1-Individuen mit *Ren9* bei 3,5 und bei anfälligen Genotypen bei 7 (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Boxplots der vergebenen Boniturnoten bei den untersuchten 35 rekombinanten Genotypen. Die Genotypen wurden nach Anwesenheit von *Ren9/Ren3*, *Ren3* beziehungsweise Abwesenheit dieser Allele gruppiert. Signifikante Unterschiede sind im Graphen dargestellt (\*\*\*\* =  $P \leq 0.001$ , \*\* =  $P \leq 0.01$ , \* =  $P \leq 0.05$ , NS = nicht signifikant  $P > 0.05$ ).

Durch einen Paardifferenztest von *Ren9*, *Ren9/Ren3* und anfälligen Individuen kann ein signifikanter Unterschied zwischen *Ren9*- bzw. *Ren9/Ren3*-tragenden Individuen zu anfälligen gezeigt werden (Abbildung 18). Ein Vergleich von *Ren9*-Individuen mit *Ren9/Ren3*-Individuen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

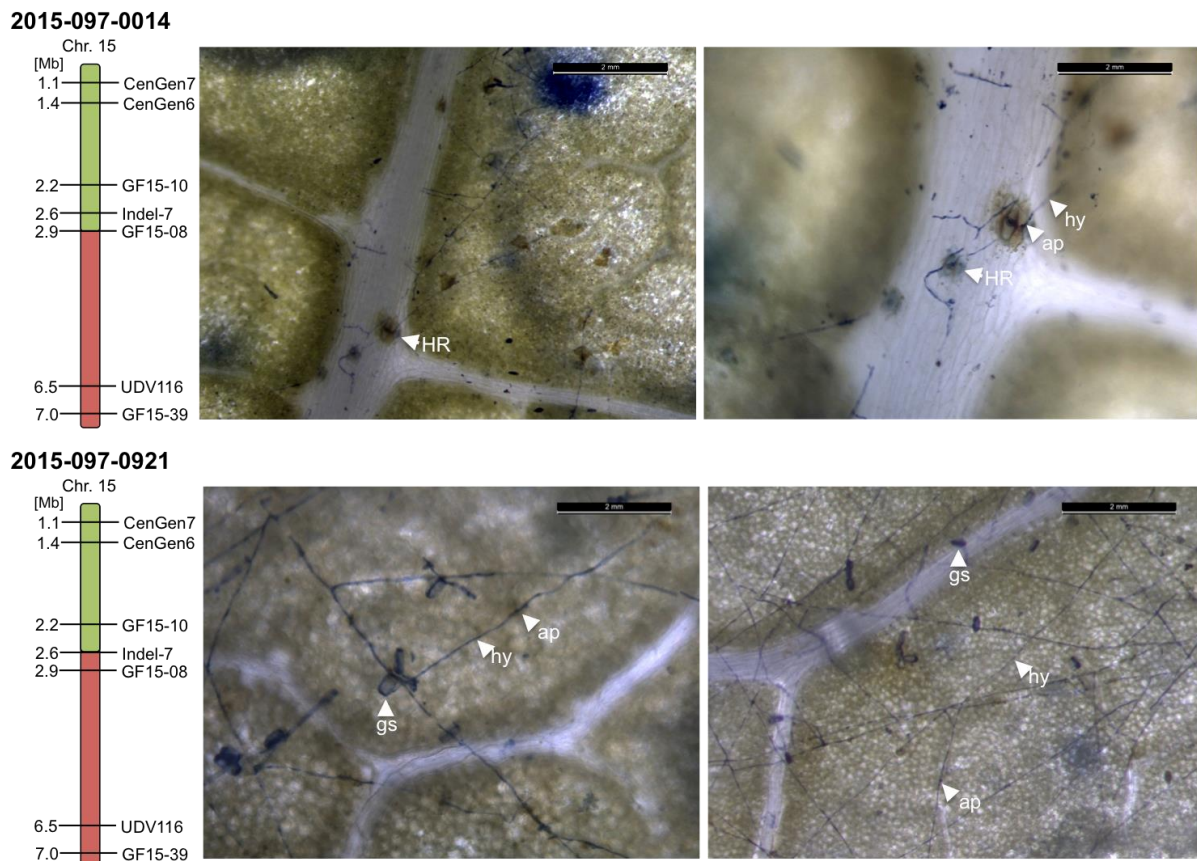
Um eine Eingrenzung des *Ren9*-Bereichs zu erzielen, wurden im Bereich von 1.1 bis 2.9 Mb weitere SSR- und InDel-Marker untersucht. Die erhaltenen Allel-Kombinationen wurden als doppelt haploid kodiert (JoinMap 4.1 Manual) und somit nur die resistente Haplophase, welche für alle untersuchten Individuen gleich ist, für die Berechnung einer genetischen Karte verwendet. Dabei wurden die mit Resistenz-assoziierten Allele der SSR- bzw. InDel-Marker mit **a** und die Abwesenheit der jeweiligen mit **b** kodiert (JoinMap Manual).



**Abbildung 19:** Dargestellt ist die genetische Karte von Chromosom 15 zusammen mit der durchgeführten Kruskal-Wallis (KW) und QTL-Analyse für Resistenz gegen *E. necator*. Das Intervall Mapping (IM) und das Multiple QTL Mapping (MQM) sind jeweils durch eine durchgezogene schwarze bzw. grüne gestrichelte Linie im Graphen dargestellt. Das Konfidenzintervall (LOD +/ 1, +/ 2) ist durch die Balken und die unterschiedlich signifikante Kopplung der jeweiligen genetischen Marker mit dem Merkmal Resistenz gegen *E. necator* ist durch die Anzahl der Sterne angegeben.

Die dadurch errechneten Positionen der genetischen Marker sind in Übereinstimmung mit ihrer physikalischen Position im Referenzgenom PN40024 12Xv0 (Jaillon *et al.*, 2007) (Abbildung 20). Um eine signifikante Kopplung von einzelnen genetischen Markern mit dem Merkmal Resistenz gegen *E. necator* festzustellen, wurde die in MapQTL 6.0 enthaltene KW-Analyse durchgeführt. Bei dieser Analyse wird jeder Marker einzeln auf seine signifikante Kopplung mit dem angegebenen Merkmal getestet. Eine signifikante Kopplung konnte hierdurch für die Marker GF15-10, Indel-7 und GF15-08 festgestellt werden ( $p < 0,005$ , Abbildung 19). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Beobachtungen in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Lemberger' (Zendler *et al.*, 2017). Durch IM- und MQM-Analyse konnte der Bereich für Resistenz gegen *E. necator* ebenfalls auf die drei Marker GF15-10, Indel-7 und GF15-08 eingegrenzt werden. Um weiter zu bestätigen, dass der Bereich um die Marker GF15-10 bis GF15-08 für Resistenz gegen *E. necator* verantwortlich ist, wurden infizierte Blätter von zwei rekombinanten Individuen (2015-097-0014 und 2015-097-0921) durch eine Trypanblau-Färbung mikroskopisch näher untersucht. Die beiden F1-Individuen wurden anhand ihrer Allel-Kombinationen ausgewählt, welche auf eine Rekombination im Bereich GF15-10 – GF15-08 hinwies. Das Individuum 2015-097-0014 wurde mit der Note 2 für Resistenz gegen *E. necator* bewertet und weist eine Rekombination

zwischen den Markern GF15-08 und Indel-7 auf, wobei GF15-08 die anfällige Allel-Kombination aufwies (Abbildung 20). Für das Individuum 2015-097-0921 wurde eine Rekombination zwischen GF15-10 und Indel-7 festgestellt. Hier wies der Marker Indel-7 die anfällige Allel-Kombination auf und das Individuum wurde mit der Note 5 bonitiert. Bei näherer Betrachtung der Trypanblau-gefärbten Blättern von Individuum 2015-097-0014 waren, assoziiert mit den gebildeten Appressorien von *E. necator*, braun/blau gefärbte Bereiche zu erkennen (HR, Abbildung 20).

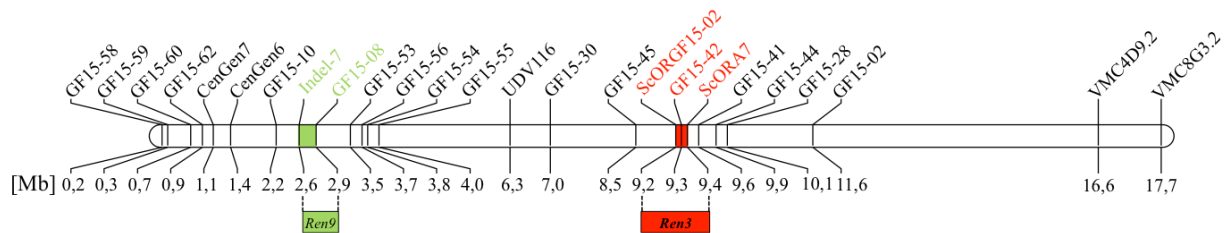


**Abbildung 20:** Ergebnisse der beiden untersuchten rekombinanten F1-Individuen. Links neben den Bildern der Trypanblau-gefärbten Blätter ist schematisch dargestellt, wo sich der Punkt der Rekombination auf Chromosom 15 befindet. Der Punkt der Rekombination ist durch den Bruch zwischen roten und grünen Bereichen markiert. Für das Individuum 2015-097-0014 liegt die Rekombination zwischen Indel-7 und GF15-08 für 2015-097-0014 zwischen GF15-10 und Indel-7. (HR = Hypersensitive Reaktion, ap = Appressorium, hy = Hyphe, gs = gekeimte Spore).

Da Trypanblau Pilze und totes Gewebe der Pflanze blau färbt, handelt es sich bei den Bereichen um die Appressorien höchst wahrscheinlich um totes Gewebe durch eine Hypersensitive Reaktion (HR) und somit um eine Resistenzantwort der Pflanze auf das Pathogen. Diese Reaktion war bei dem 2015-097-0921 nicht zu erkennen. Hier konnte jedoch ein dichtes Pilzmyzel beobachtet werden, was auf ein ungehindertes Wachstum des Pilzes hindeutet (Abbildung 20, hy).

### III.3 Kandidatengene für Resistenz gegen *E. necator* aus dem Resistenzlokus *Ren3*

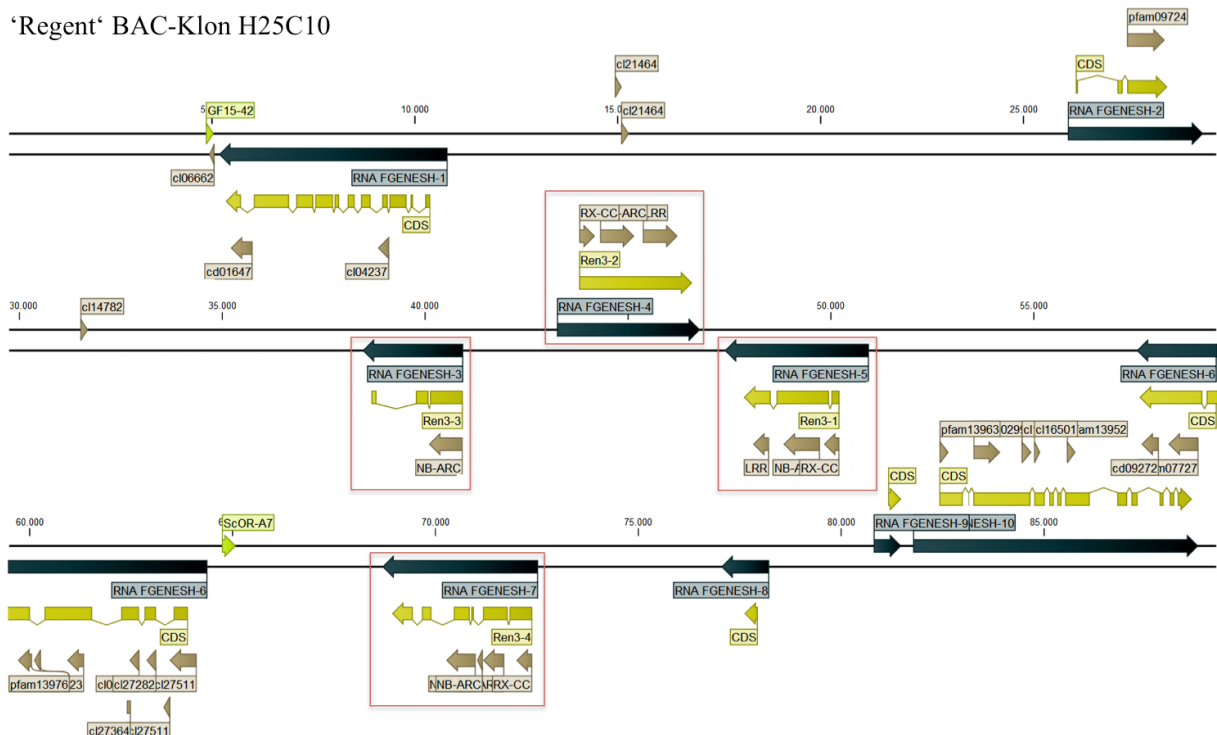
Durch QTL-Analysen und Untersuchung von rekombinanten Genotypen konnte der Resistenzlokus *Ren3* auf ein Intervall von circa 200 kb auf Chromosom 15 eingegrenzt werden (Zendler *et al.*, 2017, Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Schematische Darstellung von Chromosom 15. Es wurde die Lage von genetischen Markern mit ihrer physikalischen Position anhand des Referenzgenoms PN40024 12Xv0 eingezeichnet. Zusätzlich wurden die Bereiche der identifizierten Resistenzloci *Ren3* (rot) (Zendler *et al.*, 2017) und *Ren9* (grün) markiert.

Aus früheren Arbeiten zu *Ren3* war bereits der BAC-Klon H25C10 aus der BAC-Bank von 'Regent' in diesem Bereich bekannt, welcher mithilfe des genetischen Markers ScORA7 identifiziert worden war (Dissertation Murat Akkurt, 2004). In weiterführenden Arbeiten zu diesem Bereich konnte der BAC-Klon H25C10 mithilfe der PacBio-RSII Technologie resequenziert werden. Zusätzlich zu diesem BAC-Klon wurden hierbei weitere, flankierende BAC-Klone sequenziert (Schneider und Zyprian, unveröffentlicht).

'Regent' BAC-Klon H25C10



**Abbildung 22:** Schematische Darstellung des BAC-Klons H25C10 aus der 'Regent' BAC-Bank. Kodierte Kandidatengene wurden rot eingerahmt. Die Vorhersage der RNA (schwarz) und CDS (gelb) wurde mit FGESH (Softberry) durchgeführt. Funktionelle Domänen (braun) wurden mit dem von NCBI bereitgestellten online Programm „conserved domain search“ vorhergesagt (Schneider und Zyprian, unveröffentlicht).

**Tabelle 21:** Ergebnisse von blast-x (besten drei Treffer) und „conserved domain search“ für die gefundenen Resistenzgene und die in den flankierenden Bereichen gefundenen Gene auf dem BAC-Klon H25C10. Durch FGENESH vorhergesagte Gene für diesen BAC-Klon wurden mit „HC“ am Ende markiert.

Name	Analyse	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Ren3-1	blast-x	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100265369 [Vitis vinifera]	1453	2808	78%	0	92%	XP_010661779.2
		PREDICTED: probable disease resistance protein RF45 [Vitis vinifera]	1398	1539	77%	0	89%	XP_002269455.2
		unnamed protein product [Vitis vinifera]	1005	1127	77%	0	67%	CBI40359.3
	CDS	RX CC, NB-ARC, LRR						
Ren3-2	blast-x	PREDICTED: putative disease resistance protein At1g50180 [Vitis vinifera]	1789	1789	78%	0	98%	XP_010661992.2
		PREDICTED: disease resistance protein RPH8A like [Vitis vinifera]	1298	1298	57%	0	99%	XP_019081087.1
		PREDICTED: uncharacterized protein LOC100265369 [Vitis vinifera]	983	1892	77%	0	57%	XP_010661779.2
	CDS	RX CC, NB-ARC, LRR						
Ren3-3	blast-x	hypothetical protein VITISV_034604 [Vitis vinifera]	531	736	47%	2.00E178	92%	CAN81725.1
		PREDICTED: probable disease resistance protein RF9 [Vitis vinifera]	316	621	86%	4.00E154	55%	XP_003633889.1
		PREDICTED: putative disease resistance protein At1g50180 [Vitis vinifera]	315	616	85%	1.00E152	55%	XP_003633887.1
	CDS	NB-ARC						
Ren3-4	blast-x	PREDICTED: disease resistance protein RPP13 [Vitis vinifera]	668	1333	90%	0	82%	XP_002273976.1
		PREDICTED: uncharacterized protein LOC100265369 [Vitis vinifera]	580	2943	91%	0	94%	XP_010661779.2
		PREDICTED: probable disease resistance protein RF45 [Vitis vinifera]	442	1319	90%	0	71%	XP_002269455.2
	CDS	RX CC, NB-ARC, NB-ARC, LRR						
RNA FGENESH 1HC	blast-x	PREDICTED: uncharacterized protein LOC106779148 [Vigna radiata var. radiata]	434	570	27%	2.00E129	62%	XP_014522687.1
		Retrovirus related Pol polyprotein from transposon 17.6 [Cajanus cajan]	433	433	16%	4.00E128	63%	KYP31306.1
		PREDICTED: uncharacterized protein LOC107919841 [Gossypium hirsutum]	439	439	16%	3.00E127	63%	XP_016704721.1
	CDS	Retrotrans_gag super family, RT_LTR						
RNA FGENESH 2HC	blast-x	PREDICTED: sister chromatid cohesion protein DCC1 [Vitis vinifera]	583	739	36%	0	99%	XP_002266092.1
		PREDICTED: sister chromatid cohesion protein DCC1 isoform X3 [Juglans regia]	463	585	36%	3.00E150	75%	XP_018843519.1
		PREDICTED: sister chromatid cohesion protein DCC1 isoform X1 [Juglans regia]	463	585	36%	4.00E150	75%	XP_018843517.1
	CDS	DUF2036 (pfam09724)						
RNA FGENESH 6HC	blast-x	Copia like retrotransposon [Helianthus annuus]	717	1452	57%	0	66%	CAX68207.1
		putative zinc finger, CCHC type [Helianthus annuus]	691	1269	56%	0	64%	OTG28738.1
		Retrovirus related Pol polyprotein from transposon TNT 194 [Cajanus cajan]	632	1060	45%	0	56%	KYP64289.1
	CDS	Na_Ca_ex super family, DPBB_1 super family, BTB super family, Retrotran_gag_2, gag_pre integrs, rve, RVT_2, RNase_HI_RT_Ty1						
RNA FGENESH 8HC	blast-x	hypothetical protein VITISV_011225 [Vitis vinifera]	77	77	16%	2.00E12	62%	CAN68029.1
		hypothetical protein VITISV_028368 [Vitis vinifera]	48.5	131	26%	6.00E07	70%	CAN66618.1
		hypothetical protein VITISV_031390 [Vitis vinifera]	52.4	52.4	7%	9.00E05	83%	CAN67866.1
	CDS	N/a						
RNA FGENESH 9HC	blast-x	PREDICTED: R3H domain containing protein 2 like [Malus domestica]	48.5	48.5	38%	0.002	50%	XP_017191945.1
		PREDICTED: uncharacterized protein LOC103426912 isoform X1 [Malus domestica]	49.3	49.3	38%	0.003	50%	XP_017185473.1
		PREDICTED: uncharacterized protein LOC101300576 isoform X7 [Fragaria vesca ssp. vesca]	46.6	46.6	11%	0.003	77%	XP_004289571.1
	CDS	N/a						
RNA FGENESH 10HC	blast-x	uncharacterized protein LOC109829730 [Asparagus officinalis]	723	905	28%	0	66%	XP_020252358.1
		uncharacterized protein LOC109847006 [Asparagus officinalis]	723	1171	45%	0	66%	XP_020271836.1
		uncharacterized protein LOC109831041 [Asparagus officinalis]	721	852	26%	0	66%	XP_020253971.1
	CDS	Transpos_assoc, Transposase_21, DUF4218 super family, DUF4218 super family, DUF4216						



Der BAC-Klon B18K14 aus der 'Regent' BAC-Bank mit annotierten Genen ist in Abbildung 14 dargestellt. Der BAC-Klon umfasst eine Länge von ca. 100 kb und es konnten neben dem bereits erwähnten TIR-NBS-LRR Gen (Abbildung 23, Tabelle 22, *Ren3-5*) sechs weitere Gene durch FGENESH annotiert werden. Einige der annotierten Gene wiesen, wie auch bei dem BAC-Klon H25C10, Ähnlichkeit mit Retrotransposons auf (Tabelle 22, FGENESH-1BK, -2BK) (Schneider und Zyprian, unveröffentlicht).

**Tabelle 22:** Ergebnisse von blast-x (besten drei Treffer) und „conserved domain search“ für die gefundenen Resistenzgene und die in den flankierenden Bereichen gefundenen Gene auf dem BAC-Klon B18K14. Durch FGENESH vorhergesagte Gene für diesen BAC-Klon wurden mit „BK“ am Ende markiert.

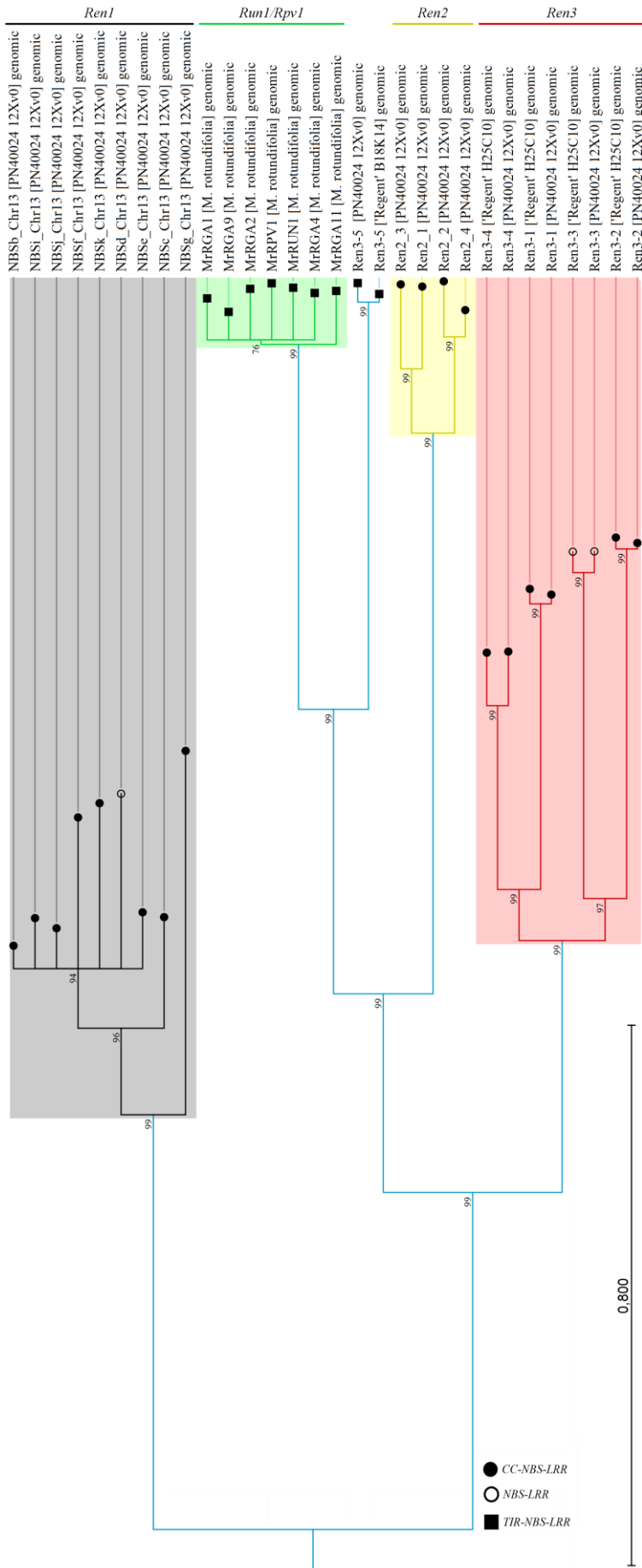
Name	Analyse	Description	Max score	Total score	Query Score	E value	Ident	Accession
<b>Ren3-5</b>	blast-x	PREDICTED: TMV resistance protein N isoform X1 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	2327	2327	0,99	0	0,98	XP_002264704.2
		PREDICTED: TMV resistance protein N isoform X2 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	1877	2072	0,89	0	0,98	XP_019080994.1
		PREDICTED: TMV resistance protein N isoform X1 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	1038	1038	0,98	0	0,49	XP_010665320.1
	CDS	TIR, NB-ARC, LRR,						
<b>RNA FGENESH 1BK</b>	blast-x	PREDICTED: putative amidase C869.01 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	346	346	0,37	4E 109	0,92	XP_019074360.1
		PREDICTED: uncharacterized protein LOC109121618 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	350	350	0,37	2E 108	0,93	XP_019071890.1
		hypothetical protein VITISV_014145 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	345	345	0,37	5E 107	0,92	CAN75147.1
	CDS	Transposase_24, Retro_tran_gag_2, DUF4787, DUF4219						
<b>RNA FGENESH 2BK</b>	blast-x	putative reverse transcriptase domain, Zinc finger, CCHC type, Aspartic peptidase domain protein [ <i>Helianthus annuus</i> ]	245	443	0,62	8E 64	0,34	OTG34130.1
		putative reverse transcriptase domain, Zinc finger, CCHC type, Aspartic peptidase domain protein [ <i>Helianthus annuus</i> ]	245	444	0,62	1E 62	0,34	OTG34128.1
		zf CCHC domain containing protein [ <i>Cephalotus follicularis</i> ]	233	442	0,58	8E 62	0,35	GAV87606.1
	CDS	retropepsin_like						
<b>RNA FGENESH 3BK</b>	blast-x	PREDICTED: mechanosensitive ion channel protein 10 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	1188	1188	0,96	0	0,99	XP_002264618.1
		hypothetical protein VITISV_007865 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	1170	1170	0,95	0	0,99	CAN79900.1
		unnamed protein product [ <i>Vitis vinifera</i> ]	1033	1033	0,79	0	0,99	CBI38205.3
	CDS	MS_Channel						
<b>RNA FGENESH 5BK</b>	blast-x	PREDICTED: cell division cycle 20.1, cofactor of APC complex [ <i>Vitis vinifera</i> ]	688	688	0,58	0	0,89	XP_019081252.1
		WD40 repeat [ <i>Macleaya cordata</i> ]	644	644	0,58	0	0,8	OVA18478.1
		unnamed protein product [ <i>Coffea canephora</i> ]	644	644	0,58	0	0,79	CDP04948.1
	CDS	WD40, Rnase_HI_RT_TY1						
<b>RNA FGENESH 6BK</b>	blast-x	hypothetical protein VITISV_010907 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	429	515	0,74	9E 144	0,82	CAN80497.1
		hypothetical protein VITISV_011486 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	447	556	0,98	5E 142	0,77	CAN74939.1
		hypothetical protein VITISV_009217 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	425	611	0,99	1E 140	0,74	CAN66302.1
	CDS	N/A						
<b>RNA FGENESH 7BK</b>	blast-x	unnamed protein product [ <i>Vitis vinifera</i> ]	764	764	0,33	0	0,96	CBI21499.3
		PREDICTED: E3 ubiquitin protein ligase RKP [ <i>Vitis vinifera</i> ]	764	764	0,33	0	0,96	XP_002276278.2
		hypothetical protein VITISV_022486 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	700	700	0,3	0	0,96	CAN66347.1
	CDS	N/A						



Bei dem Gen FGENESH-3BK handelt es sich wahrscheinlich um ein mechano-sensitives Ionenkanal-Protein und FGENESH-7BK kodiert für eine mögliche E3-Ubiquitin-Ligase laut blast-x Abgleich (Tabelle 22). Für das annotierte Gen FGENESH-6BK konnten keine Übereinstimmungen gefunden werden.

Vergleicht man die gefundenen RGAs mit bereits bekannten RGAs so wird deutlich, dass der Aufbau mit einer variablen N-terminalen Domäne (CC = Coiled Coil, TIR= Toll/Interleukin Receptor), der NB-ARC (Nucleotide Binding - APAF1, R-Gene, CED4) und der variablen LRR (Leucin Rich Repeat) Domäne hoch konserviert ist (Baggs *et al.*, 2017; Sekhwal *et al.*, 2015). Diese Genfamilie wurde bereits in anderen Pflanzen wie z. B. *A. thaliana* (*RPM1*, *RPS4*, *RPS5*, *RPP8*, uvm.), *Solanum lycopersicum* (Pto), *Solanum tuberosum* (*Rx*, *Rx2*, *Gpa2*) und *Capsicum annuum* (*Bs2*) als Resistenzvermittler gegen unterschiedliche Pathogene assoziiert (DeYoung & Innes, 2006; Rairdan & Moffett, 2006). In der Weinrebe wurden bereits 12 unterschiedliche Resistenzloci charakterisiert, welche Resistenz gegen *E. necator* vermitteln. Für drei der 12 Loci konnten mittlerweile schon solche Kandidatengene identifiziert werden, welche die Resistenz gegen *E. necator* vermitteln könnten. Für *Run1/Rpv1* wurde gezeigt, dass in diesem Locus ein Cluster von sieben TIR-NBS-LRR Genen kodiert ist. Es wurde durch Transformation von anfälligen Genotypen gezeigt, dass zwei der sieben Gene jeweils Resistenz gegen *E. necator* (*MrRUN1*) und *P. viticola* (*MrRPV1*) vermitteln (Feechan *et al.*, 2013). Für den *E. necator* Resistenzlocus *Ren1* wurde ebenfalls ein Cluster von neun CC-NBS-LRR Genen beschrieben. Hier konnte durch ein „Fine Mapping“ der QTL Bereich auf ein Gen eingegrenzt werden. Eine funktionelle Analyse wurde jedoch noch nicht durchgeführt ( Hoffmann *et al.*, 2008; Coleman *et al.*, 2009; Cadle Davidson *et al.*, 2016). *Ren2* konnte ebenfalls auf einen Bereich eingegrenzt werden welcher vier CC-NBS-LRR Gene umfasst, die hohe Ähnlichkeit zu dem aus *A. thaliana* bekannten *Rpm1* Gen besitzen, welches Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* vermittelt (Cadle Davidson *et al.*, 2016).

Erstellt man aus den genomischen Sequenzen der Kandidatengene einen phylogenetischen Stammbaum so wird deutlich, dass die Gene der jeweiligen Resistenzloci am nächsten mit sich verwandt sind, was durch die Gruppierung der jeweiligen Kandidatengene in „Subtrees“ verdeutlicht wird (Abbildung 24). Da die Sequenzen der Gene von *Ren2* aus *Vitis cinerea* Illinois547-1 noch nicht bekannt sind, wurden die im Referenzgenom PN40024 12Xv0 kodierten Gene für den phylogenetischen Stammbaum verwendet. Zusätzlich zu den sequenzierten RGAs von *Ren3* aus 'Regent' wurden noch die homologen Gene aus dem Referenzgenom PN40024 12Xv0 mit einbezogen.



**Abbildung 24:** Phylogenetischer Stammbaum der beschriebenen RGAs aus den Loci *Ren1* (schwarz), *Run1/Rpv1* (grün), *Ren2* (gelb) und den vier Kandidatengenen aus *Ren3* (rot). Das Phylogram wurde mit der CLC Genomics Workbench erstellt (Starting Tree Algorithm: UPGMA, Nucleotide substitution model: GTR, Include rate variation, Nr. of substitutions per rate: 4, Gamma dist. para.: 1, Bootstrap: 100). Das Alignment hierfür wurde mit webPRANK erstellt (Löytynoja & Goldman, 2010). Es wurden Knoten mit Bootstrap Werten größer als 70 angegeben. Die Symbole der Endpunkte zeigen an um welche Art von RGA es sich bei den Genen handelt.

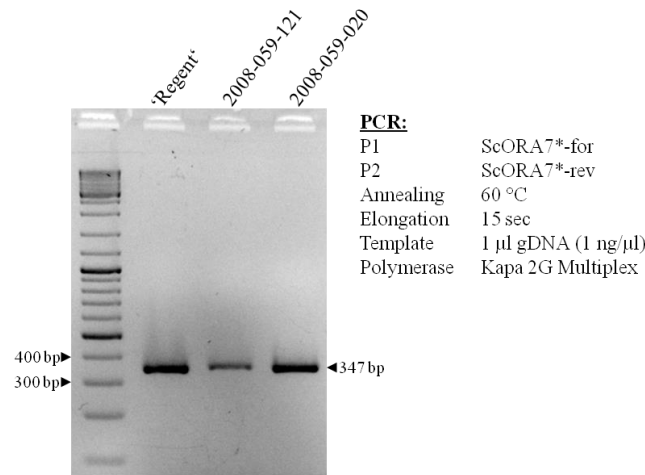
Durch den phylogenetischen Stammbaum konnten die RGAs der einzelnen Resistenzloci gruppiert werden. Die Gene des Resistenzlokus *Run1/Rpv1* unterscheiden sich durch ihre TIR Domäne von den RGAs der anderen Resistenzloci. Jedoch unterscheiden sich die RGAs des Locus *Ren1* am stärksten von den anderen Resistenzloci. Die homologen Gene aus PN40024 12Xv0 zu den identifizierten RGAs aus *Ren3* aus 'Regent' weisen Unterschiede auf, welche bei *Ren3-4* am deutlichsten sind (Abbildung 24). Das Gen *Ren3-5*, welches auf dem BAC-Klon B18K14 identifiziert wurde, ist bedingt durch seine N-terminale TIR Domäne hierbei am nächsten mit denen aus *Run1/Rpv1* verwandt. Obwohl es sich bei den Kandidatengenen aus *Ren1*, *Ren2* und *Ren3* um Gene des Typs CC-NBS-LRR handelt, sind hier ebenfalls deutliche Unterschiede erkennbar (Abbildung 24).

### III.3.1 Transkriptanalyse der *Ren3* Kandidatengene

Da für die oben beschriebenen Kandidatengene aus *Ren3* durch die Sequenzierung der BAC-Klone nur die genomische Sequenz bekannt und somit nur eine *in silico* Vorhersage der Transkripte möglich war, wurde ein Large Gap Read Mapping (LGRM) mit Transkript Discovery (TD) (CLC Genomics Workbench), 3'- und 5'RACE, CR-RT-PCRs und RT-PCRs durchgeführt, um die jeweiligen Transkripte der Kandidatengene zu charakterisieren. Für die Analysen wurden zwei Individuen der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Lemberger' (2008-002-016, 2008-002-027), 'Regent' und zwei Individuen aus der Kreuzungspopulation GF.GA52 42 x 'Solaris' (2008-059-020, 2008-059-121) verwendet. Die beiden 'Regent' x 'Lemberger' F1-Individuen wiesen in der SSR-Marker-Analyse homozygote 'Chambourcin'-(Vater und Resistenzdonor von 'Regent') Allele für Chromosom 15 auf (Daten nicht gezeigt).

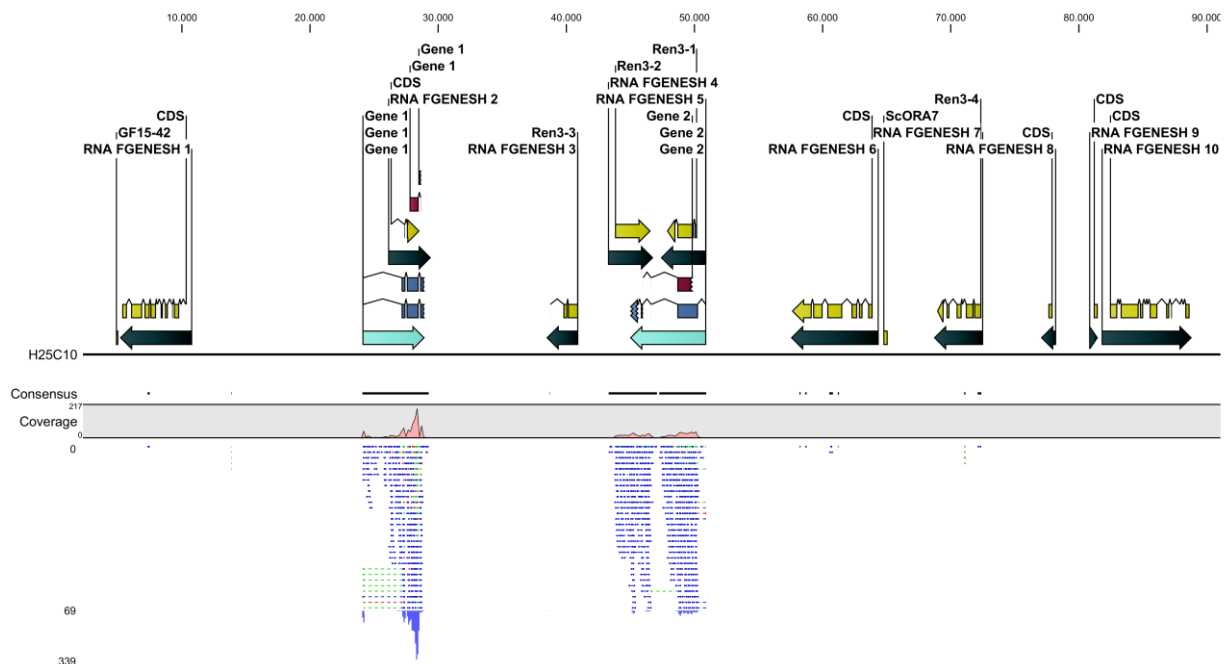
#### III.3.1.1 LGRM und Transcript discovery für *Ren3* Kandidatengene

Mithilfe von RNAseq Daten aus früheren Arbeiten mit den Resistenzloci *Rpv3* und *Rpv10* wurde im ersten Schritt zur Untersuchung der Transkription der möglichen Kandidatengene ein LGRM mit TD durchgeführt (II.2.16.1). Als Referenz für das LGRM dienten hierbei die sequenzierten BAC-Klone H25C10 und B18K14, welche bereits mithilfe von FGENESH und CDS annotiert waren (Abbildung 22, Abbildung 23, Tabelle 21, Tabelle 22). Um eindeutig nachzuweisen, dass die Individuen 2008-059-020 und 2008-059-121 (GF.GA-52-42 x 'Solaris') *Ren3*-Träger darstellen, wurde eine PCR mit dem genetischen Marker ScORA7 durchgeführt (Abbildung 25), für welchen eine eindeutige Kopplung mit dem Resistenzlokus *Ren3* bereits in früheren Arbeiten gezeigt wurde (Akkurt *et al.*, 2006; Eibach *et al.*, 2007; Welter *et al.*, 2007; Zandler *et al.*, 2017).



**Abbildung 25:** Ergebnisse der Gelelektrophorese der PCR-Fragmente zur Amplifikation des genetischen Markers ScORA7\*. PCR Bedingungen und die verwendete Polymerase sind rechts neben dem 1 % Agarosegel angegeben.

Als Positivkontrolle der PCR wurde 'Regent' DNA verwendet, die wie die DNA der F1-Individuen ein PCR-Fragment mit einer Größe von 347 bp liefert (Abbildung 25). Da dieser Marker dominant für die Anwesenheit des Resistenzlokus *Ren3* ist bestätigt dieses Ergebnis das Vorhandensein des Resistenzlokus in den Testpflanzen. Im folgenden Schritt wurde das LGRM mit anschließender TD durchgeführt. Als Referenz für das „Read Mapping“ wurden, wie bereits erwähnt, die beiden sequenzierten Regent BAC-Klone H25C10 und B18K14 verwendet.



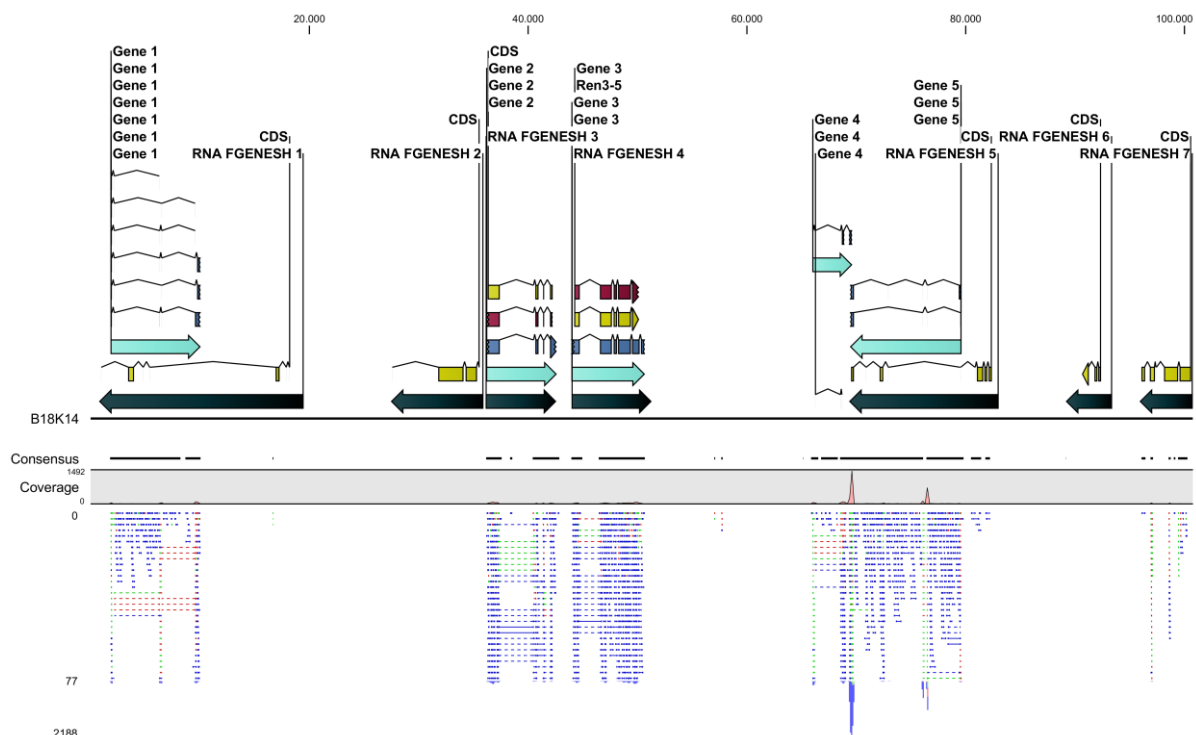
**Abbildung 26:** Ergebnisse des LGRM mit angeschlossener TD für den BAC-Klon H25C10. RNAs und CDSs, die durch FGENESH vorhergesagt wurden, sind in schwarz bzw. gelb dargestellt. Die Vorhersagen der TD sind in Türkis (RNA), hellblau (mRNA) und rot (CDS) dargestellt.

Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, konnten für zwei der zuvor durch FGENESH annotierten Gene auf dem BAC-Klon H25C10 ebenfalls durch LGRM und TD Transkripte in diesen Bereichen detektiert werden. Für das Gen FGENESH-2HC was für *VvDCC1* kodiert, konnten zwei unterschiedliche Splice-Varianten entdeckt werden (Abbildung 26, Tabelle 23). In dem Bereich von *Ren3-1* und *Ren3-2* konnten 431 Reads „aligned“ werden (Tabelle 23). Das vorhergesagte Transkript liegt auf dem negativen Strang und umfasst den Bereich von *Ren3-1* und *Ren3-2* (Tabelle 21, Tabelle 23). Für die anderen durch FGENESH vorhergesagten möglichen RGAs *Ren3-3* und *Ren3-4*, konnten durch LGRM und TD keine Transkripte detektiert werden.

**Tabelle 23:** Ergebnisse der „Transcript Discovery“ für den BAC-Klon H25C10.

Gen	Kor. Gen	Länge	Position H25C10	Strang	Transkripte	Längstes Transkript	Reads	Spliced Reads
Gene 1 HC	FGENESH 2	4851	24088..28938	+	2	1721	877	126
Gene 2 HC	<i>Ren3-1, Ren3-2</i>	5939	44981..50919		1	2641	431	15

Das LGRM und TD mit dem BAC-Klon B18K14 lieferte Transkripte für die vorhergesagten Gene FGENESH-2BK und -5BK sowie *Ren3-5* (Abbildung 27, Tabelle 24).



**Abbildung 27:** Ergebnisse des LGRM mit angeschlossener TD für den BAC-Klon B18K14. RNAs und CDSs die durch FGENESH vorhergesagt wurden, sind in schwarz bzw. gelb dargestellt. Die Vorhersagen der TD sind in Türkis (RNA), hellblau (mRNA) und rot (CDS) dargestellt.

Zusätzlich konnten zwei weitere Transkripte detektiert werden die nicht durch FGENESH vorhergesagt waren. Das vorhergesagte Gen Gene-1BK liegt im Bereich von FGENESH-1BK jedoch auf dem positiven Strang (Abbildung 27, Tabelle 24). Das Gen Gene 4 BK wurde vor FGENESH-5BK auf dem positiven Strang detektiert.

**Tabelle 24:** Ergebnisse der „Transcript Discovery“ für den BAC-Klon B18K14.

Gen	Kor. Gen	Länge	Position B18K14	Strang	Transkripte	Längstes TransKript	Reads	Spliced Reads
<b>Gene 1 BK</b>		8233	1814..10046	+	3	917	225	118
<b>Gene 2 BK</b>	FGENESH 3 BK	6448	36157..42604	+	1	2489	713	94
<b>Gene 3 BK</b>	Ren3-5	6717	43951..50667	+	1	4432	1210	106
<b>Gene 4 BK</b>		3649	65972..69620	+	1	798	605	70
<b>Gene 5 BK</b>	FGENESH 5 BK	10194	69430..79623		2	879	2623	679

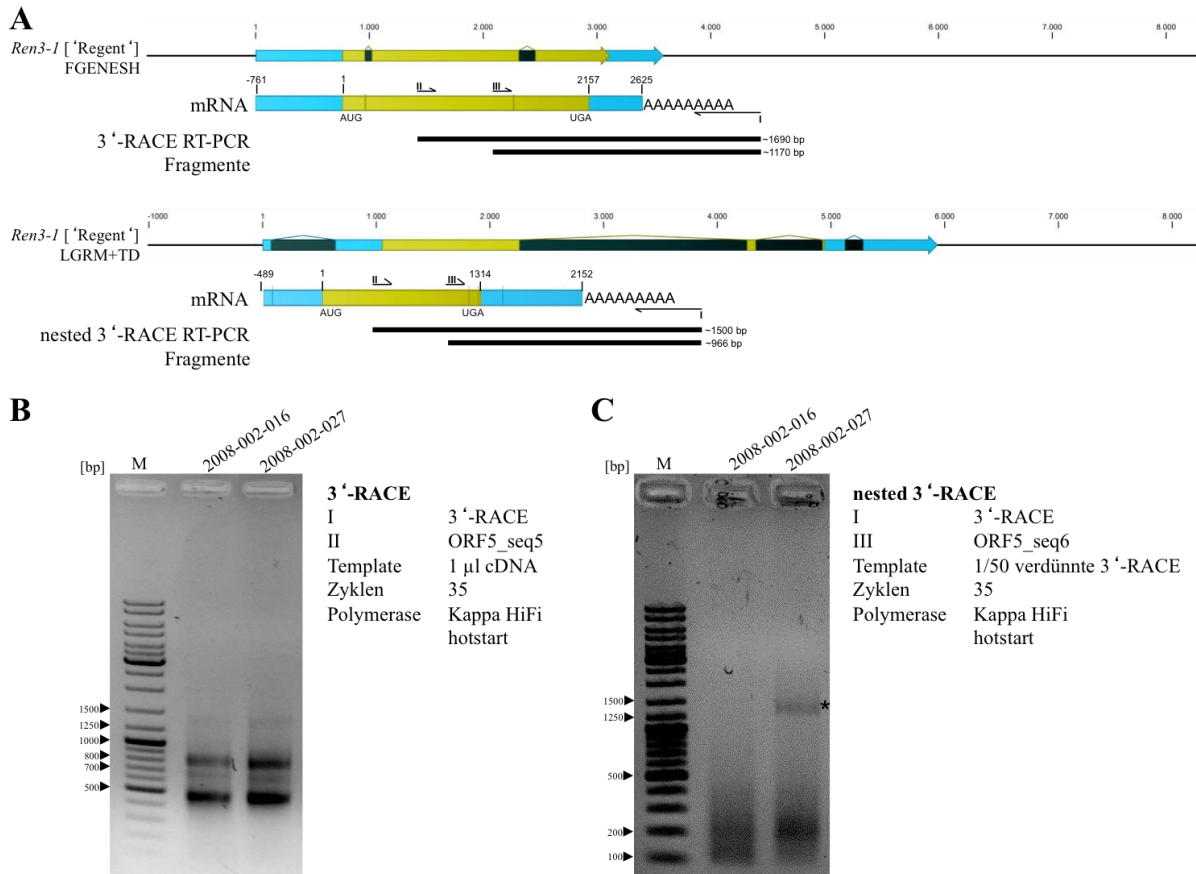
Für die beiden Gene Gene-1BK und -5BK wurden zusätzlich unterschiedliche Splice-Varianten detektiert (Tabelle 24). Diese Splice Varianten der TD von FGENESH-3BK und *Ren3-5* stimmen mit denen der FGENESH Vorhersage überein (Abbildung 27).

### III.3.1.2 Analyse von *Ren3-1* aus 'Regent'

Durch die Ergebnisse des LGRM mit TD, wurde in den folgenden Analysen das Kandidatengen *Ren3-1* näher untersucht. Das gefundene TIR-NBS-LRR (*Ren3-5*) wurde, bedingt durch seine Lage außerhalb des beschriebenen QTLs für den Resistenzlocus *Ren3*, nicht weiter untersucht. Für die Untersuchung des *Ren3-1* Transkriptes mittels 3', 5'RACE und RT-PCR wurden cDNAs von F1-Individuen der 'Regent' x 'Lemberger' Population verwendet. Bei der durchgeführten 5'RACE wurde die CAP-Struktur der mRNA mittels der TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) entfernt. Für die durchgeführte CR-RT-PCR wurde cDNA von 'Regent' verwendet. Hierbei wurde das Enzym RppH (RNA-5'-Pyrophosphohydrolase) zur Entfernung der Cap-Struktur verwendet. Diese Analysen wurden ebenfalls für die drei weiteren Kandidatengene *Ren3-2*, *-3* und *-4* durchgeführt. Jedoch konnten hierbei keine positiven Klone sequenziert werden.

#### III.3.1.2.1 3' RACE von *Ren3-1*

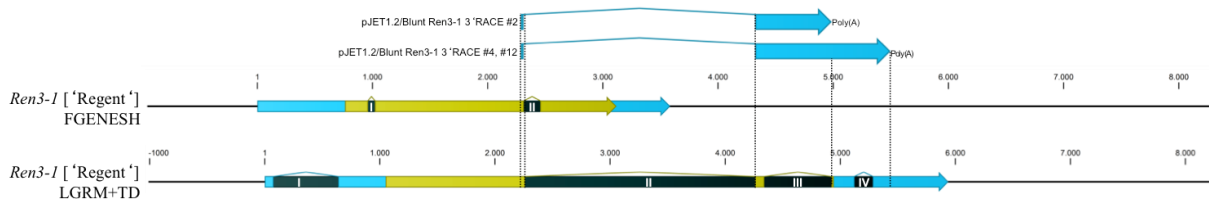
Für die Analyse des 3'-Endes des *Ren3-1* Transkriptes wurde eine 3'RACE sowie eine „nested“ 3'RACE durchgeführt (II.2.16.2). Für die durchgeführte 3'RACE waren zwei unterschiedliche Fragmentgrößen durch die *in silico* Vorhersage von FGENESH und des LGRM+TD vorhergesagt (Abbildung 28, A). Mit den verwendeten cDNAs (2008 002 016, 2008 002 027) konnten in der 3'RACE Fragmente von etwa ~1500 bp, ~750 bp und ~500 bp amplifiziert werden (Abbildung 28, B).



**Abbildung 28:** A Schematische Darstellung der *Ren3-1* Transkriptvorhersage durch FGENESH und LGRM+TD. Die Vorhergesagte RNA (schwarz), mRNA (blau) und CDS (gelb) wurden eingezeichnet. Zusätzlich wurden noch die prozessierten mRNAs dargestellt, bei denen die Introns herausgespliced sind und ein Poly-Adenin Stretch am 3'-Ende angefügt ist. Die erwarteten RT-PCR-Fragmente der beiden unterschiedlichen Transkripte sind unterhalb durch schwarze Balken eingezeichnet. **B** Ergebnisse der 3'RACE mit den homozygoten F1-Individuen aus 'Regent' x 'Lemberger'. Für diese Reaktion wurde die Oligonukleotidkombination I (3'RACE) und II (ORF5\_seq5) gewählt, deren Lage in **A** dargestellt ist. **C** Ergebnisse der „nested“ 3'RACE mit den Oligonukleotiden A (3'RACE) und C (ORF5\_seq6). Als Template wurde 1µl von der 1:50 verdünnten 3'RACE verwendet. Der Stern markiert die Bande, welche ausgeschnitten und für eine Sequenzierung kloniert wurde.

Die erwarteten Fragmente waren hier für FGENESH ~1690 bp bzw. ~1500 bp für LGRM+TD (Abbildung 28, A). Das schwache Signal bei ungefähr 1500 bp könnte somit der Vorhersage des LGRM+TD entsprechen. Bei der anschließenden „nested“ 3'RACE konnte mit der 1:50 verdünnten 3'RACE des Individuums 2008-002-027 ein Fragment mit einer Größe von ungefähr 1350 bp amplifiziert werden (Abbildung 28, C). Diese Größe war weder mit FGENESH noch mit LGRM+TD vorhergesagt (Abbildung 28, A). Dieses Fragment wurde im Anschluss wie in II.2.10 beschrieben in den Vektor pJET1.2/Blunt kloniert und sequenziert.

Es wurden drei positiv getestete Klone sequenziert. Dabei konnten zwei unterschiedliche 3'-Enden detektiert werden (Abbildung 29). Das 3'-Ende, das durch die Klone pJET1.2/Blunt *Ren3-1* 3'RACE #4 und #12 sequenziert wurde, ist dabei 507 bp länger als das des Klons #2.



**Abbildung 29:** Schematische Darstellung der erhaltenen cDNA Sequenzen nach Sequenzieren des klonierten „nested“ 3'RACE Fragments. Es wurden die vorhergesagten mRNAs (blau) und CDSs (gelb) eingezeichnet. Vorhergesagte Introns wurden nummeriert (FGENESH I und II; LGRM+TD I – IV). Die sequenzierten 3'-Enden wurden in Blau über den Transkriptvorhersagen dargestellt.

Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, konnte mit der durchgeführten 3'RACE das durch das LGRM+TD vorhergesagte Intron II detektiert werden (Abbildung 29, Tabelle 25). Die beiden Introns III und IV konnten jedoch nicht detektiert werden. Die vorhergesagte 5'-Splice-Position von FGENESH Intron II stimmt mit der detektierten ebenfalls überein (Abbildung 29).

**Tabelle 25:** Übersicht der identifizierten Introns mit ihrer vorhergesagten Länge von FGENESH und LGRM+TD.

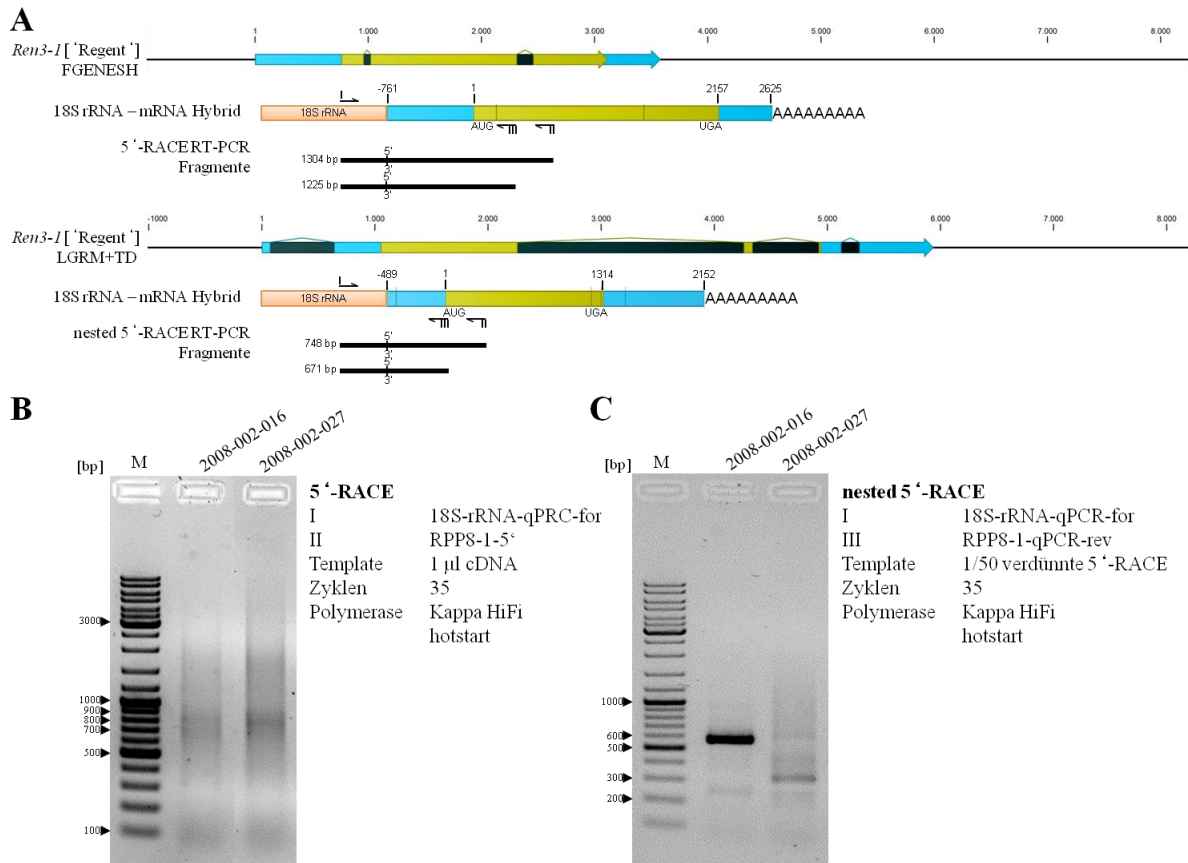
	I	II	III	IV
<b>FGENESH</b>	57 bp	141 bp		
<b>LGRM+TD</b>	561 bp	1997 bp	583 bp	157 bp

### III.3.1.2.2 5' RACE von *Ren3-1*

Für die Analyse des 5'-Endes von *Ren3-1* wurden die cDNAs wie in II.2.13 und II.2.14.3 beschrieben aus ligierter gesamt RNA synthetisiert. Durch den hohen Anteil von rRNA in der gesamt RNA wurde die 18S rRNA als Linker verwendet, welcher in einer ungerichteten Reaktion an das 5'-Ende der *Ren3-1* mRNA ligiert wurde (s. II.2.16.2 5'RACE).

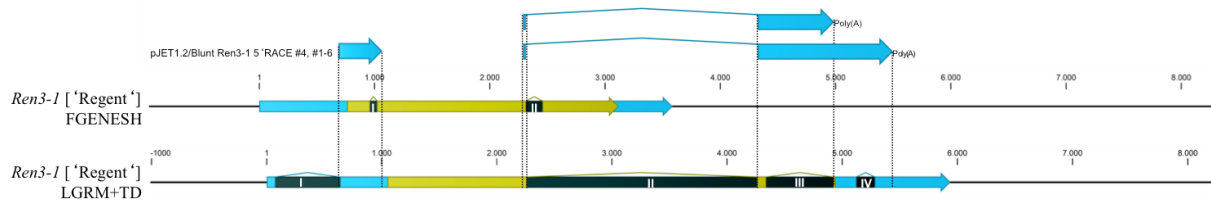
Durch die Vorhersage von FGENESH war in der durchgeführten 5'RACE ein RT-PCR-Fragment von 1304 bp zu erwarten, wohingegen durch LGRM+TD ein etwa halb so großes Fragment (748 bp) vorhergesagt war (Abbildung 30, A). Bei der durchgeführten 5'RACE konnte mit den beiden verwendeten cDNAs von *Ren3* homozygoten F1-Individuen kein distinktes PCR Produkt amplifiziert werden (Abbildung 30, B). Im Bereich zwischen 700 – 1000 bp konnte jedoch ein stärkeres Signal detektiert werden, welches in etwa der Vorhersage des LGRM+TD entsprach (Abbildung 30, A und B).





**Abbildung 30:** A Schematische Darstellung der *Ren3-I* Transkriptvorhersage durch FGENESH und LGRM+TD. Die vorhergesagte RNA (schwarz), mRNA (blau) und CDS (gelb) wurden eingezeichnet. Es wurden zudem die hybriden RNAs ausprozessierter mRNA (herausgesplite Introns, Poly(A)-stretch) und der an das 5'-Ende ligierten 18S rRNA dargestellt. Die erwarteten RT-PCR-Fragmente der beiden unterschiedlichen Transkripte sind unterhalb durch schwarze Balken eingezeichnet. **B** Ergebnisse der 5'-RACE mit den homozygoten F1-Individuen aus 'Regent' x 'Lemberger'. Für diese Reaktion wurde die Oligonukleotidkombination I (18S rRNA-for) und II (RPP8-1-5') gewählt, deren Lage in (A) dargestellt ist. **C** Ergebnisse der „nested“ 5'-RACE mit den Oligonukleotiden I (18S rRNA qPCR for) und III (RPP8 1 qPCR rev). Als Template wurde 1µl von der 1:50 verdünnten 5'-RACE verwendet.

Für die nested 5'-RACE waren Fragmente von 1225 bp durch FGENESH und 671 bp durch LGRM+TD vorhergesagt (Abbildung 30, A). Das längste und gleichzeitig das in der größten Menge vorhandene Fragment wurde mit der cDNA des Individuums 2008-002-016 amplifiziert und hatte eine Größe von etwa 550 bp (Abbildung 30, C). Zusätzlich war hier noch ein schwaches Signal bei einer Größe von ca. 250 bp erkennbar. Mit der cDNA des Individuums 2008-002-027 konnte ebenfalls das 550 bp Fragment detektiert werden jedoch war das Signal hier sehr schwach. Neben diesem Fragment waren noch Fragmente mit einer Größe von 300 und 200 – 250 bp erkennbar (Abbildung 30, C). Das etwa 550 bp große Fragment des Individuums 2008-002-016 wurde ausgeschnitten, aufgereinigt und im Anschluss in den Vektor pJET1.2/Blunt wie in II.2.10 beschrieben kloniert. Es wurden sechs positive getestete Klone sequenziert.

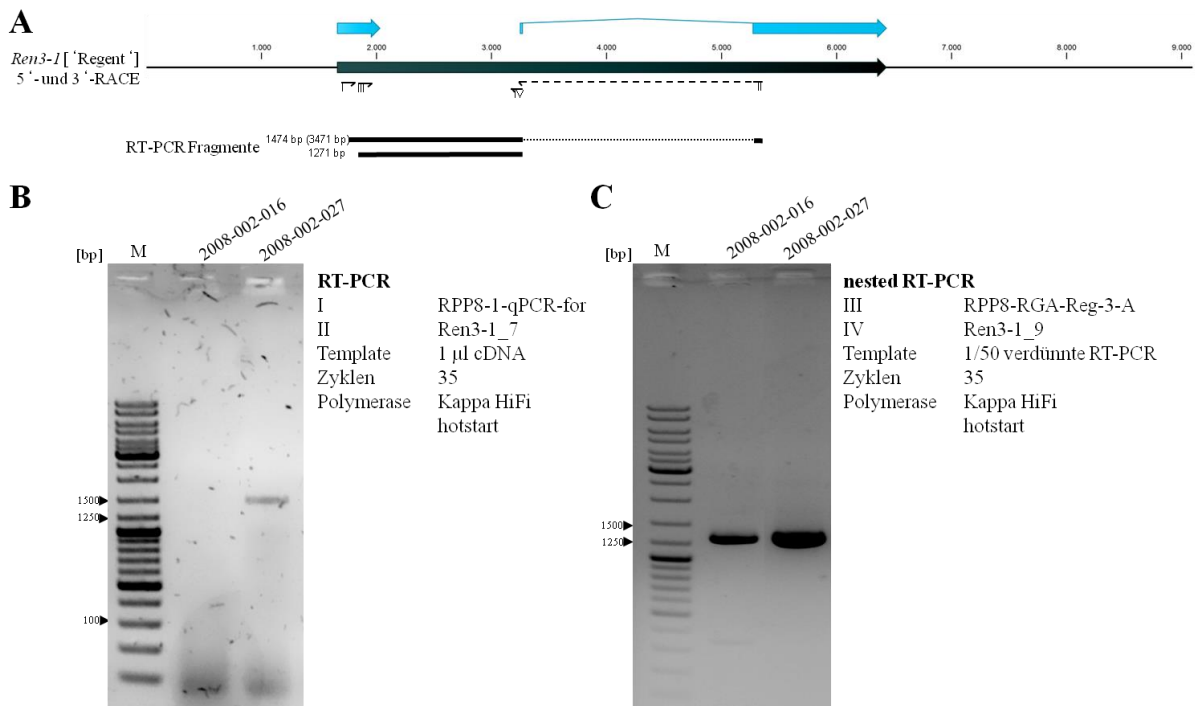


**Abbildung 31:** Darstellung des sequenzierten 5'-Ende von Ren3-1 durch 5' RACE. Das neue 5'-Ende ist in Lila eingezeichnet zusammen mit den Ergebnissen der 3' RACE (blau) und der FGENESH Vorhersage.

Die sechs sequenzierten Klone (pJET1.2/Blunt Ren3-1 5' RACE 1 6) zeigten alle dasselbe 5'-Ende. Das sequenzierte 5'-Ende ist kürzer als die beiden vorhergesagten Enden von FGENESH und LGRM+TD und das Intron I der jeweiligen Vorhersage konnte nicht bestätigt werden (Abbildung 31, Tabelle 25). Das sequenzierte 5'-Ende liegt 8 bp Strom-aufwärts des zweiten Exons aus der LGRM+TD Vorhersage.

### III.3.1.2.3 RT-PCR von *Ren3-1*

Um die Lücke zwischen 5'RACE und 3'RACE zu schließen wurden eine RT-PCR und „nested“ RT-PCR durchgeführt (Abbildung 31).

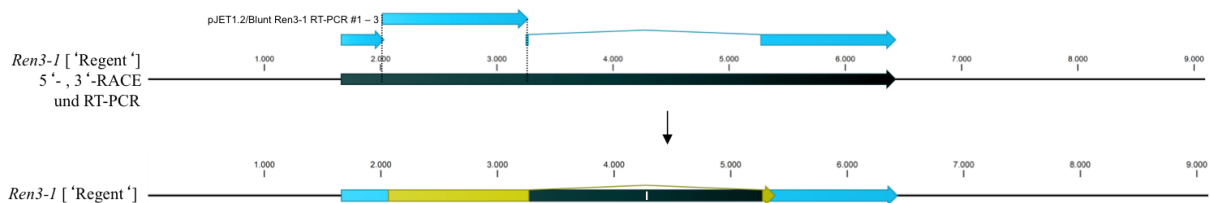


**Abbildung 32:** A Schematische Darstellung der 5' und 3' RACE Ergebnisse von Ren3-1. Zusätzlich wurden noch die Bindestellen der Oligonucleotide für die Amplifikation des Lückenschlusses mittels „nested“ RT-PCR eingezeichnet (schwarze Pfeile) B Ergebnisse der RT-PCR mit den Oligonucleotiden I (RPP8 1 qPCR for) und II (Ren3-1\_7) mit den cDNAs der homozygoten F1-Individuen aus 'Regent' x 'Lemberger' C Ergebnisse der „nested“ RT-PCR mit den Oligonucleotiden III (RPP8 RGA Reg 3 A) und IV (Ren3-1\_9).

Das verwendeten Oligonucleotid Ren3-1\_7 (Abbildung 32, A II) wurde Intron-überspannend entworfen um das in der 5'RACE erhaltene Transkript zu amplifizieren. Bei der RT-PCR mit den cDNAs der homozygoten F1-Individuen aus 'Regent' x 'Lemberger' war ein 1474 bp

großes Fragment erwartet, sofern es kein weiteres Splice-Ereignis in diesem Bereich gibt (Abbildung 32, A). Mit der cDNA 2008-002-027 konnte ein etwa 1500 bp großes Fragment amplifiziert werden, was mit dieser Erwartung übereinstimmt (Abbildung 32, B). Durch eine „nested“ RT-PCR konnte im nächsten Schritt mit den cDNAs der Individuen 2008-002-016 und 2008-002-027 das erwartete Fragment von 1271 bp amplifiziert werden (Abbildung 32, C). Die beiden Fragmente wurden aufgereinigt, vereinigt und anschließend in den Vektor pJET1.2/Blunt kloniert und sequenziert (s. II.2.10 Klonierung von PCR-Fragmenten).

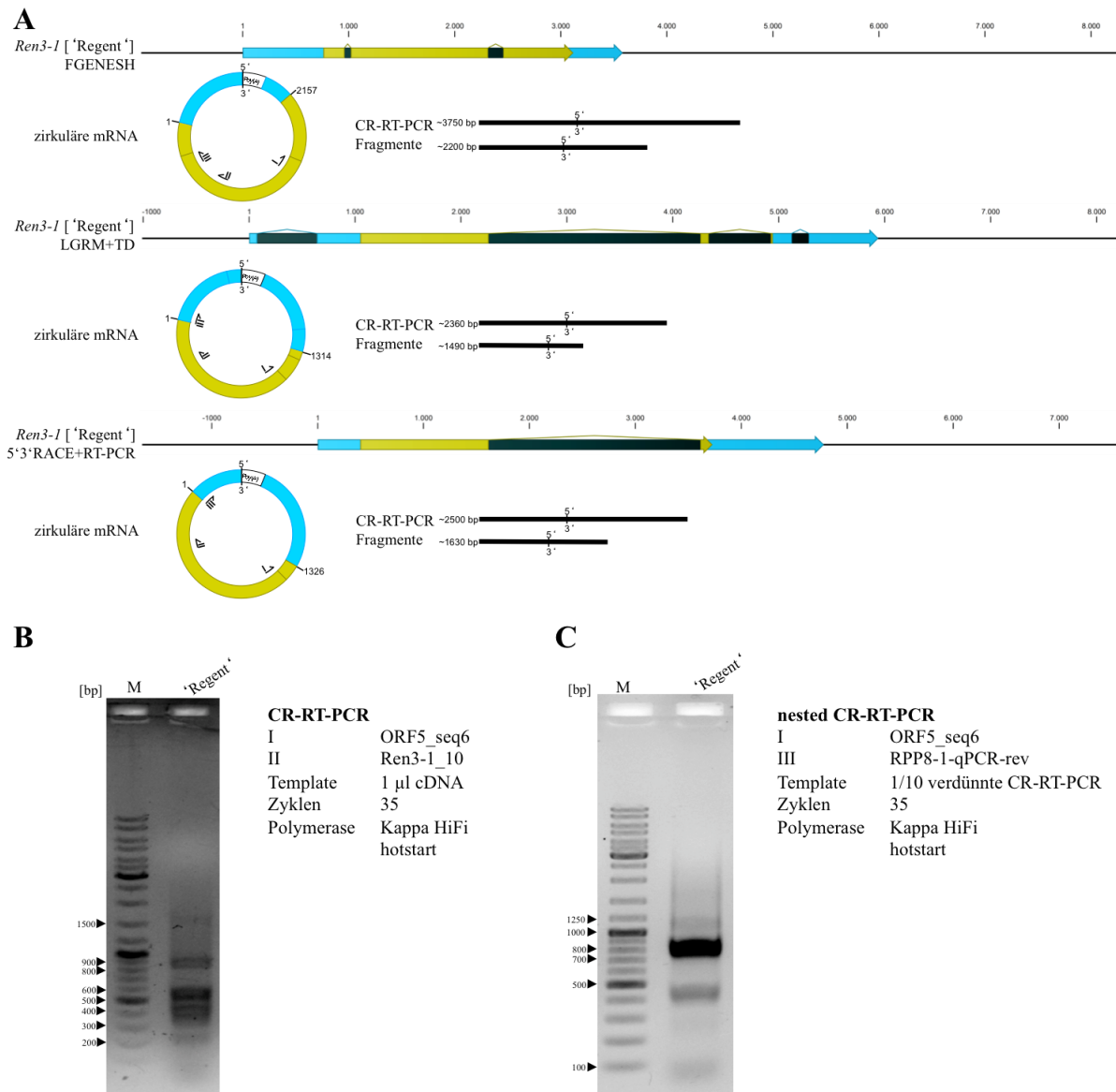
Durch die Sequenzierung des RT-PCR-Fragments konnte die Lücke zwischen 5' und 3'RACE geschlossen werden (Abbildung 33). In dem sequenzierten Bereich war kein weiteres Intron zu finden und somit ergab sich die CDS wie in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33:** Darstellung des sequenzierten RT-PCR-Fragments und des daraus resultierenden *Ren3-1* Transkriptes aus 'Regent' mit 5'- / 3'-UTR (blau), der CDS (gelb) und dem identifizierten Intron I (identisch mit LGRM+TD Intron II).

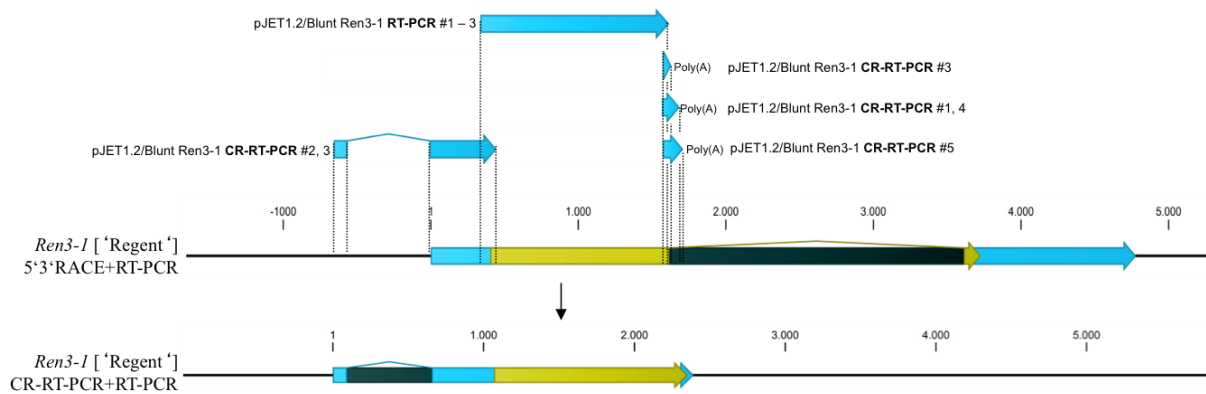
#### III.3.1.2.4 CR-RT-PCR von *Ren3-1*

Da die Analyse eines Transkriptes durch 5'-, 3'RACE und RT-PCR getrennte Ergebnisse darstellen, wurden mithilfe einer CR-RT-PCR simultan die Exon / Intron Struktur und die Transkriptenden von *Ren3-1* untersucht (s. II.2.16.4). Die hierfür verwendete cDNA wurde aus RNA von 'Regent' revers transkribiert. Um die mRNA mithilfe der T4-RNA-Ligase mit sich selbst zu ligieren, wurde des Enzyms RppH verwendet, um die Cap-Struktur zu entfernen (s. II.2.12.2 RNA 5'-Pyrophosphohydrolase (RppH)). Durch die beiden unterschiedlichen Vorhersagen durch FGESH und LGRM+TD waren bei der „nested“ CR-RT-PCR mit den verwendeten Oligonukleotiden Fragmente von etwa 2200 bp (FGESH) und 1490 bp (LGRM+TD) erwartet (Abbildung 34). Zusätzlich zu den beiden *in silico* Vorhersagen war bedingt durch das experimentell nachgewiesene *Ren3-1* (5'-, 3'RACE und RT-PCR) Transkript ein weiteres Fragment möglich mit einer Größe von etwa 1630 bp (Abbildung 34). Die Gelelektrophorese der CR-RT-PCR lieferte mehrere unterschiedlich große Fragmente im Bereich von 800 – 900 bp und um 300 – 600 bp (Abbildung 34, B). Keines der detektierten Fragmente stimmte mit den vorhergesagten Größen überein (Abbildung 34, A).



**Abbildung 34:** A Schematische Darstellung der *Ren3-1* Transkriptvorhersage durch FGESH und LGRM+TD und der durchgeführten 5', 3' RACE und RT-PCR. Die vorhergesagte RNA (schwarz), mRNA (blau), CDS (gelb) und der Poly(A)-stretch in den zirkularisierten mRNAs wurden eingezeichnet. Die erwarteten RT-PCR-Fragmente der unterschiedlichen Transkripte sind daneben durch schwarze Balken eingezeichnet. B Ergebnisse der CR-RT-PCR mit cDNA von 'Regent'. Für diese Reaktion wurde die Oligonukleotidkombination I (ORF5\_seq6) und II (Ren3-1\_10) gewählt deren Lage in (A) dargestellt ist. C Ergebnisse der „nested“ CR-RT-PCR mit den Oligonukleotiden I (ORF5\_seq6) und III (RPP8-1-qPCR-rev). Als Template wurde 1 µl von der 1:50 verdünnten CR-RT-PCR verwendet.

Bei der anschließenden „nested“ CR-RT-PCR konnten ebenfalls mehrere Fragmente detektiert werden, die aber ebenfalls nicht mit der vorhergesagten Größe übereinstimmen (Abbildung 34, A, C). Das Fragment mit dem stärksten Signal zwischen 700 – 800 bp wurde ausgeschnitten, aufgereinigt, kloniert und im Anschluss sequenziert. Die Fragmente bei 100, 500 und zwischen 1000 und 1250 bp wurden nicht weiter untersucht (Abbildung 34, C). Es wurden fünf positiv getestete Klone sequenziert, welche die in Abbildung 35 dargestellten Fragmente enthielten.



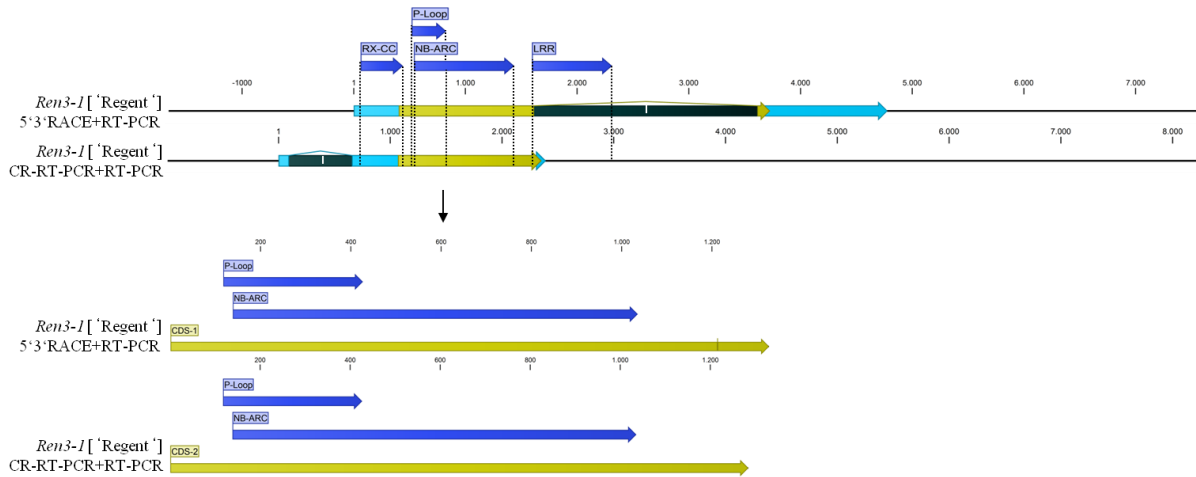
**Abbildung 35:** Darstellung der fünf sequenzierten Klone mit den „nested“ CR-RT-PCR-Fragmenten projiziert auf das Transkript der 5', 3' RACE+RT-PCR. Das resultierende Transkript der CR-RT-PCR ist unterhalb dargestellt. Es wurden jeweils die RNA (schwarz), die 5' und 3' UTR Bereiche (blau) und CDS (gelb) eingezeichnet.

Durch die Kombination der sequenzierten CR-RT-PCR-Fragmente mit der zuvor sequenzierten RT-PCR ergab sich das in Abbildung 35 dargestellte Transkript. Bei diesem Transkript konnte das vorhergesagte Intron I des LGRM+TD nachgewiesen werden (Abbildung 35, Tabelle 25). Es wurde jedoch ein weiteres 3'-Ende detektiert, welches sich von dem der durchgeführten 3'RACE dadurch unterschied, dass das Intron II (LGRM+TD) nicht vorhanden war (Abbildung 35). Aus der CR-RT-PCR Analyse ergibt sich somit ein alternatives Transkript zusätzlich zu dem der 5', 3'RACE und RT-PCR Auswertung (Abbildung 35). Eine Übersicht der vorhergesagten und experimentell nachgewiesenen Transkripte ist in Abbildung 61 dargestellt.

### III.3.1.2.5 Funktionelle Domänen der beiden *Ren3-1* Transkripte

Für die beiden unterschiedlichen Transkripte wurden die funktionellen Domänen mithilfe des „Conserved Domain Search“ (NCBI) vorhergesagt, um mögliche Unterschiede in den beiden abweichenden kodierenden Bereichen feststellen zu können. Es wurden die genomischen Bereiche und die beiden kodierenden Bereiche analysiert (Abbildung 36).

Bei dem Vergleich konnte gezeigt werden, dass, wie schon zuvor beschrieben, im genomischen Bereich von *Ren3-1* die typischen funktionellen Domänen wie CC, NB-ARC mit P-Loop (ATP Bindestelle) und LRR vorhanden sind (Abbildung 36). Analysiert man dagegen nur den kodierenden Bereich der beiden Transkripte so wird deutlich, dass letztendlich nur die NB-ARC-Domäne translatiert wird. Die LRR-Domäne wird entweder durch ein Splice-Event deletiert (Abbildung 36, 3', 5'RACE+RT-PCR) oder erst gar nicht in eine mRNA transkribiert (Abbildung 36, CR-RT-PCR+RT-PCR). Die CC-Domäne liegt bei beiden Transkripten außerhalb des kodierenden Bereichs (Abbildung 36).



**Abbildung 36:** Schematische Darstellung der beiden detektierten Transkripte von *Ren3-1* und die beiden kodierenden Bereiche ohne Introns. Die durch den Conserved Domain Search (NCBI) gefundenen funktionellen Domänen sind in dunkelblau oberhalb der beiden Transkripte und der kodierenden Bereiche dargestellt. Es wurden die mRNA (blau), die CDS (gelb) und die gefundenen Introns (schwarz) eingezeichnet.

### III.4 Funktionelle Analyse von *Ren3-1*

Um eine funktionelle Analyse des Resistenzkandidatengens *Ren3-1* durchführen zu können wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Dabei wurden bei der ersten Methode sogenannte „artificial microRNA“ (amiRNA) Konstrukte generiert, welche die mRNA von *Ren3-1* als Ziel hatten. Mit diesen Konstrukten wurde die Rebsorte 'Regent' transformiert, was schlussendlich zu einem Knock-down des Gens führen soll. Da gezeigt wurde, dass 'Regent' neben dem Resistenzlokus *Ren3* noch den Lokus *Ren9* besitzt, wäre bei diesem Versuch eine verminderte Resistenzantwort bedingt durch den Knock-down von *Ren3-1* zu erwarten.

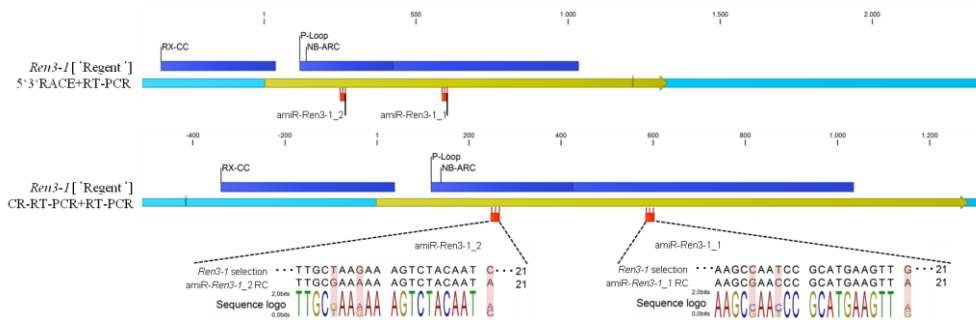
Bei der zweiten Methode wurde der genomische Bereich von *Ren3-1* mit nativem Promotor und Terminator in einen Pflanzentransformationsvektor kloniert und dieses Konstrukt in die beiden anfälligen Rebsorten 'Riesling' und 'Chardonnay' transformiert.

#### III.4.1 Knock-down von *Ren3-1* aus *Ren3* in 'Regent'

##### III.4.1.1 Erstellung der amiRNAs für *Ren3-1* als RISC DICER Ziel

Für den gezielten Knock-down von *Ren3-1* aus dem *Ren3*-Lokus, wurden amiRNA Konstrukte generiert. Die komplementäre amiRNA dient dabei als „Guide“, um den RISC/DICER Komplex zu der Ziel-RNA zu führen, um diese endonukleolytisch zu schneiden und dadurch deren Abbau durch Exoribonukleasen einzuleiten (Brodersen & Voinnet, 2006). Für *Ren3-1* wurden zwei unterschiedliche amiRNAs wie in II.2.17 beschrieben generiert, welche beide einen Schnitt in der vorhergesagten NB-ARC Domäne induzieren sollen (Abbildung 37). Die Bindestelle der amiRNA-Ren3-1\_2 wurde in diesem Fall in die

vorhergesagte Kinase-1 (P-Loop) gelegt, welche für die Bindung für ATP/GTP verantwortlich ist (Abbildung 37) (Sekhwal *et al.*, 2015).

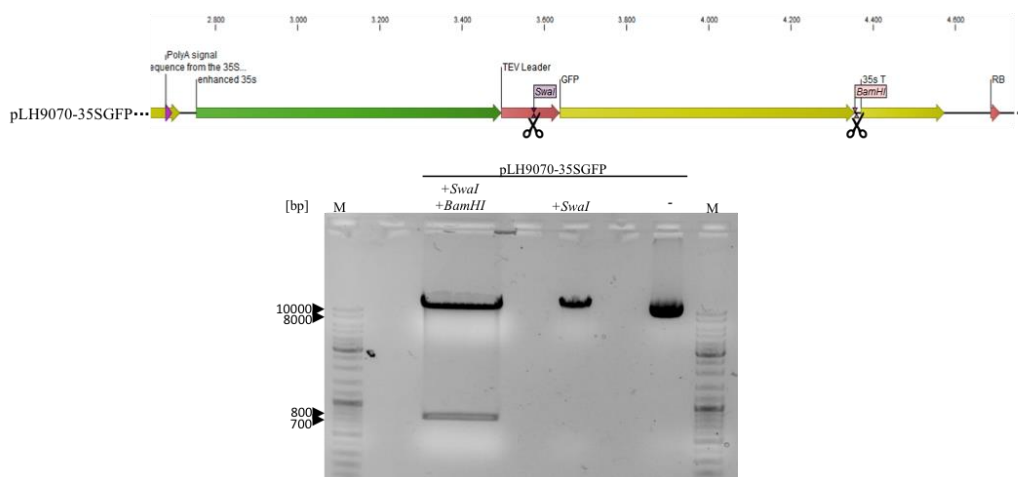


**Abbildung 37:** Schematische Darstellung der beiden *Ren3-1* Transkripte aus 'Regent' mit 5' / 3' UTR (Türkis), funktionellen Domänen (dunkelblau), CDS (gelb) und den Bindestellen der generierten amiRNAs (rot, amiR *Ren3-1\_1/2*). Ein Sequenzalignement der revers komplementären amiRNAs mit der Sequenz von *Ren3-1*. SNPs zwischen amiRNA und *Ren3-1* wurden rot hinterlegt.

Die Anforderungen aus II.2.17.1 Erstellung von Artificial miRNAs für die Erstellung von amiRNAs, wurden weitgehend eingehalten. Das einzige Kriterium, welches bei beiden amiRNAs nicht erfüllt werden konnte, war das Adenin an Position 10 (amiR-*Ren3-1\_1* Pos.10: Cytosin, amiR-*Ren3-1\_2* Pos.10: Thymin).

### III.4.1.2 Klonierung der amiRNA Konstrukte in pLH9070-35S

Die generierten amiRNAs wurden in den Vektor pJET1.2/Blunt kloniert und sequenziert. Im Anschluss wurden die amiRNA Konstrukte in den Vektor pLH9070-35SGFP umklontiert. Um die amiRNAs konstitutiv in der Zielpflanze zu transkribieren wurde die *GFP*-kodierende Sequenz aus pLH9070-35SGFP herausgeschnitten und der 35S-Promotor beibehalten (Abbildung 38).

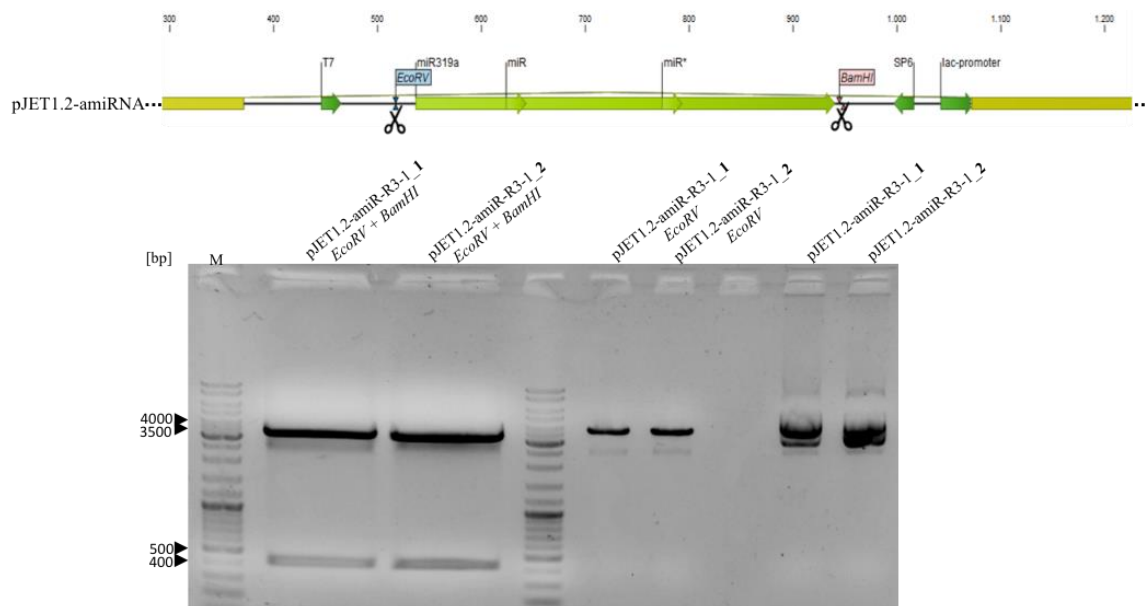


**Abbildung 38:** Schematische Darstellung der durchgeführten Restriktion von pLH9070-35SGFP mit *SwaI* und *BamHI* zur Entfernung der *GFP*-kodierenden Sequenz. Die Restriktion wurde mithilfe einer Gelelektrophorese kontrolliert.

Die Bande bei 10 kb (Abbildung 38, pLH9070-*GFP SwaI + BamHI*) entsprach ihrer Größe nach dem Vektor pLH9070 mit 35S-Promotor (11413 bp) und wurde deshalb ausgeschnitten

und aufgereinigt. Die zweite Bande zwischen 700 und 800 bp entsprach der *GFP*-kodierenden Sequenz (783 bp) die mit *SwaI* (blunt) und *BamHI* (sticky) ausgeschnitten wurde.

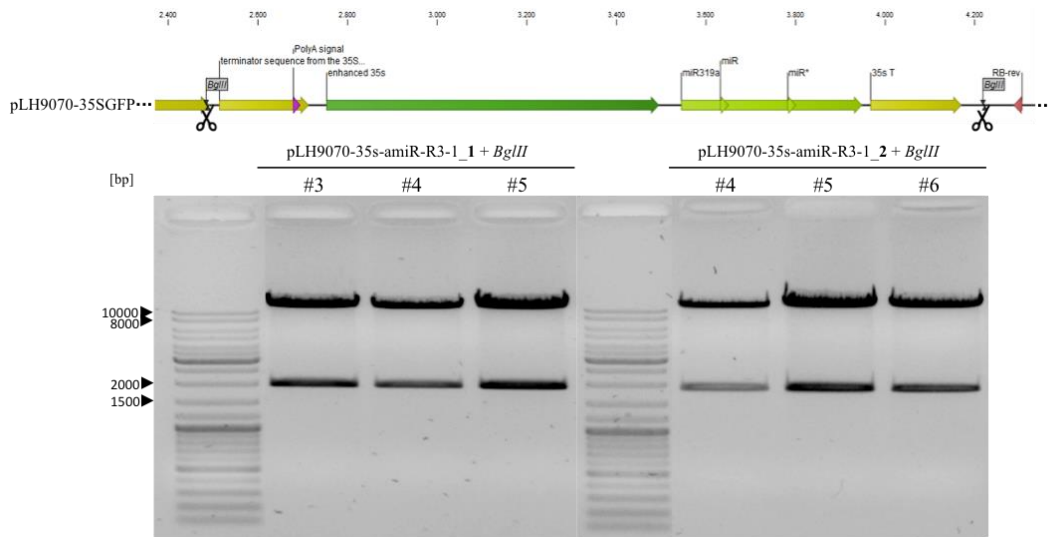
Die generierten amiRNA Konstrukte, welche in den Vektor pJET1.2/Blunt kloniert worden waren, wurden mithilfe der Enzyme *EcoRV* (blunt) und *BamHI* (sticky) aus diesem herausgeschnitten und durch eine Gelelektrophorese aufgereinigt. Die Bande zwischen 400 und 500 bp entsprach den amiRNA Konstrukten amiR-*Ren3-1\_1* bzw. *\_2* (Abbildung 39, 429 bp). In einer Ligation wurden die amiRNA Konstrukte über die komplementären Schnitte (*SwaI* – *EcoRV*, *BamHI*) in pLH9070-35S eingefügt. Das generierte Plasmid wurde anschließend in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Kolonien von Transformanten wurden in Flüssigkultur überführt für eine anschließende Plasmidpräparation.



**Abbildung 39:** Schematische Darstellung der Restriktion von pJET2.1 amiR *Ren3-1\_1/2* mit *EcoRV* und *BamHI*. Die Restriktion wurde im Anschluss mithilfe einer Gelelektrophorese kontrolliert.

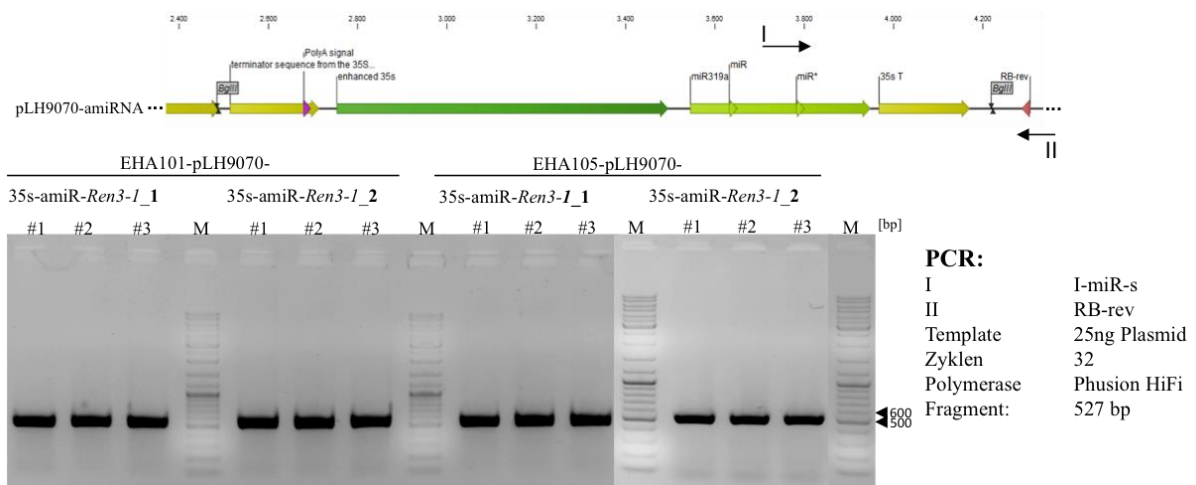
Zur Kontrolle der generierten pLH9070-35S-amiR-*Ren3-1\_1* bzw. *\_2* Konstrukte wurde mit dem Enzym *BglII* eine Restriktion mit den aufgereinigten Plasmiden durchgeführt. In Abbildung 40 sind jeweils drei positive Klone dargestellt. Das erwartete Schnittmuster war 10070 bp für das Plasmid und 1738 bp für das 35S-amiR-*Ren3-1\_1* bzw. *\_2* Konstrukt. Alle getesteten Klone wiesen das erwartete Schnittmuster auf (Abbildung 40).





**Abbildung 40:** Schematische Darstellung der Restriktion von pLH9070-35S amiR *Ren3-1\_1/2* mit *BglIII*. Es sind pro Konstrukt jeweils drei positive Klone in der Gelelektrophorese dargestellt.

Für die Transformation von *A. tumefaciens* EHA101 und EHA105 in einem triparentalen Mating wurde jeweils amiR-*Ren3-1\_1* #3 und amiR-*Ren3-1\_2* #5 verwendet (s. II.2.10.5 Triparentales Mating für die Transformation von *A. tumefaciens*). Kolonien die aus dem durchgeführten triparentalen Mating hervorgegangen waren, wurden mithilfe einer PCR kontrolliert.

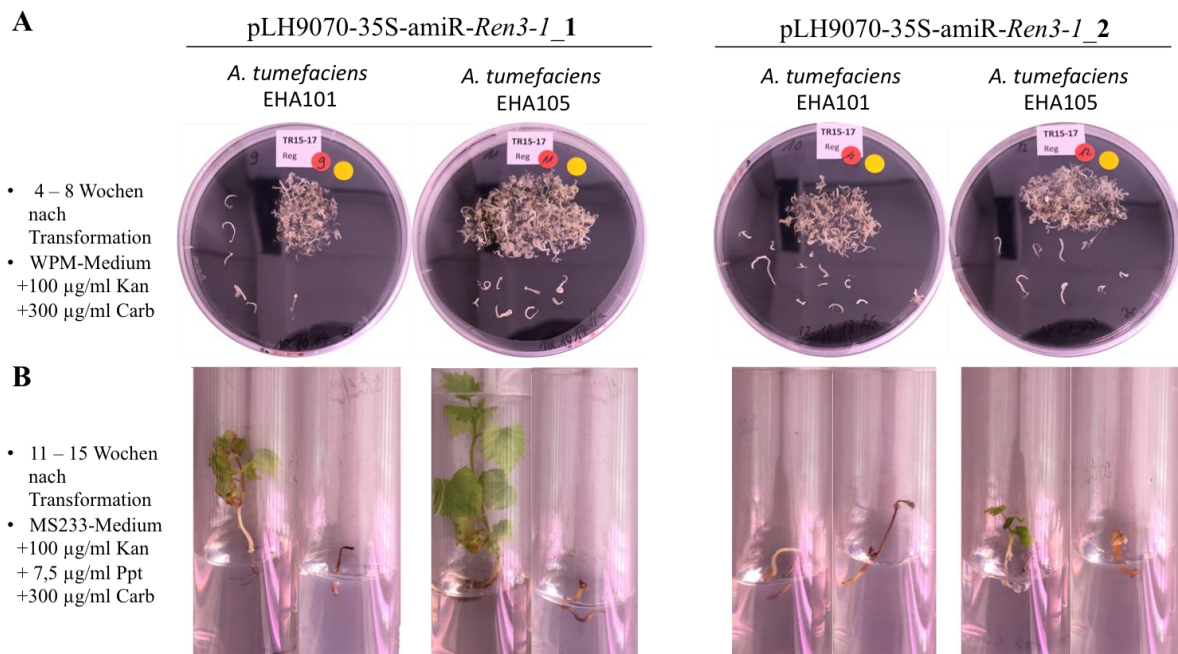


**Abbildung 41:** Kontroll PCR der *A. tumefaciens* EHA101 und EHA105 Klone nach Transformation mit pLH9070-35S-amiR-*Ren3-1\_1/2*. Über der Gelelektrophorese sind schematisch die Bindestellen der verwendeten Oligonukleotide für die PCR Reaktion dargestellt.

Dabei wurde jeweils von drei Kolonien eine Übernachtskultur angesetzt und eine anschließende Plasmidpräparation durchgeführt. Für die PCR wurde ein Insert-spezifisches (I miR s) und ein Plasmid-spezifisches (RB rev) Oligonukleotid verwendet (Abbildung 41). Das erwartete Fragment von 527 bp war bei allen untersuchten Klonen deutlich sichtbar (Abbildung 41).

### III.4.1.3 Transformation von 'Regent' mit pLH9070-35S-amiR-*Ren3-1\_1* und *\_2* und anschließende Selektion von transgenen Pflanzen

Für die Transformation von embryogenen 'Regent' Zellkulturgewebe wurde jeweils der erste Klon von *A. tumefaciens* EHA101 und EHA105 pLH9070-35S-amiR-*Ren3-1\_1* bzw. *\_2* verwendet. Die beiden *A. tumefaciens* Klone mit den generierten amiRNA-Konstrukten, wurden an die Arbeitsgruppe von Dr. Margit Harst übergeben. Mit diesen Klonen wurde im Anschluss embryogenes Gewebe von 'Regent' transformiert. Nach der Transformation wurde das Gewebe zur Regeneration und Selektion auf WPM-Medium mit 100 µg/ml Kanamycin gesetzt. Sobald im Gewebe einzelne Embryonen erkennbar waren, wurden diese vereinzelt und auf MS233 Medium mit 100 µg/ml Kanamycin zuerst bei Dämmerlicht und später bei normalem Licht gezogen bis sich grüne Blättchen bildeten (Abbildung 42, A). Zu diesem Stadium wurde eine zusätzliche Selektion mit Phosphinothricin (7,5 µg/ml) im Medium durchgeführt (Abbildung 42, B). Transgene Embryonen sollten resistent gegen dieses Herbizid sein, welches den Hauptbestandteil des kommerziell vertriebenen Basta<sup>®</sup> darstellt. Phosphinothricin hemmt die Glutaminsynthetase, welche während der Photorespiration freies Ammoniak aus der Synthese von Serin durch den Glycinderboxylierungs-Komplex wieder fixiert. Durch die Insertion der T-DNA von pLH9070 wird neben den amiRNA Konstrukten und der Kanamycin Resistenz, das *bar* Gen in das Genom der Pflanze inseriert.



**Abbildung 42:** **A** Regenerierte und teilweise vereinzelt Embryonen aus embryogenem Zellkulturgewebe von 'Regent' nach Transformation mit den beiden amiRNA Konstrukten amiR-*Ren3-1\_1* und *\_2*. Es wurden jeweils die Agrobakterienstämme EHA101 und EHA105 für die Transformation verwendet. **B** Vereinzelt, regenerierte Pflanzen auf Doppelselektionsmedium mit 100 µg/ml Kanamycin und 7,5 µg/ml Phosphinothricin. (WPM = McCown Woody Plant Medium (Duchefa), MS233 = Murashige & Skoog Medium M0233 (Duchefa), Kan = Kanamycin, Carb = Carbenicilin, Ppt = Phosphinothricin) (Von der Arbeitsgruppe Dr. Harst durchgeführte Arbeiten)

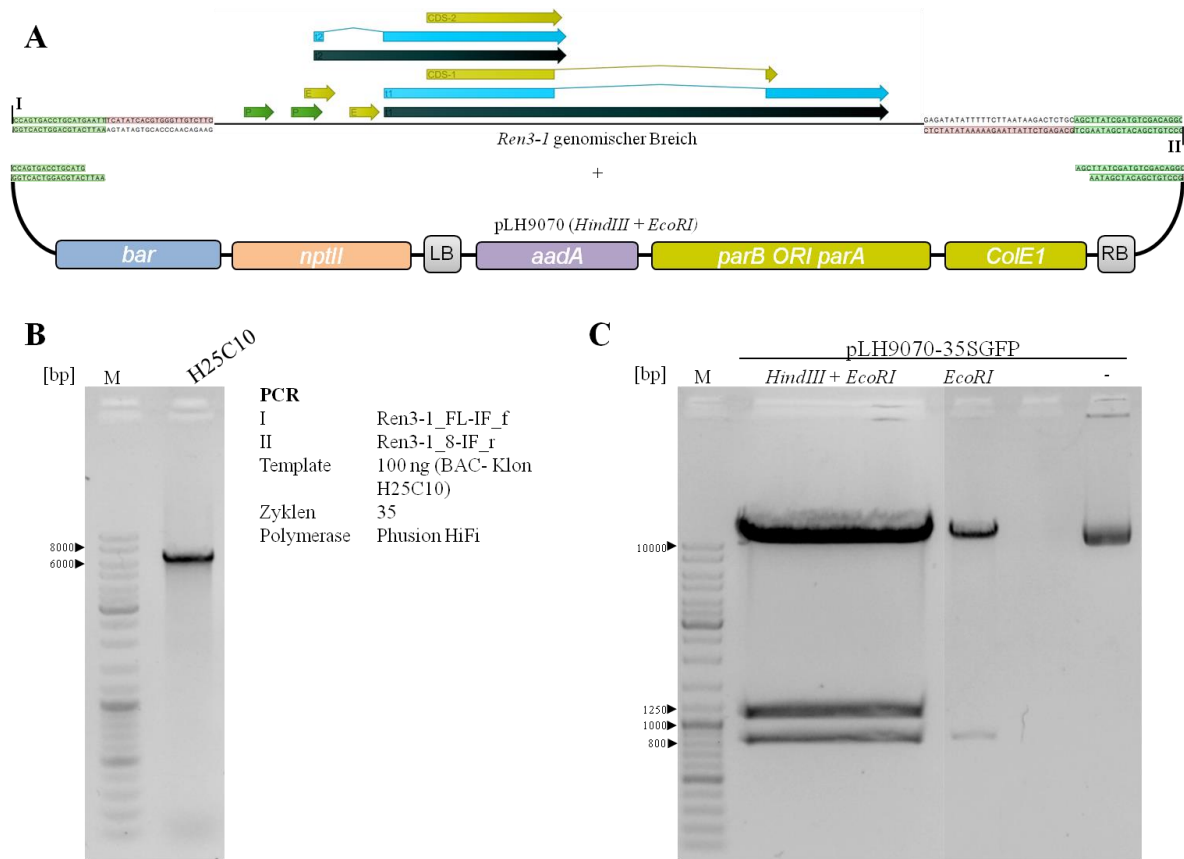
Bei diesem Gen handelt es sich um eine Phosphinothricin-Acetyltransferase durch die Phosphinothricin unwirksam gemacht wird und Pflanzen somit auf diesem Selektionsmedium normal wachsen können (Abbildung 42, B). Wie zu erkennen ist, führt die Doppelselektion mit Kanamycin und Phosphinothricin dazu, dass der Spross von nicht transformierte Pflanzen nach kurzer Zeit braun wird und nicht weiter wächst. Pflanzen, die dagegen möglicherweise transgen sind, zeigen ein normales Wachstum (Abbildung 42, B). Des Weiteren ist zu erkennen, dass Pflanzen, welche mit dem *amiR-Ren3-1\_2* Konstrukt transformiert wurden ein verlangsamtes Wachstum aufweisen, im Gegensatz zu *amiR-Ren3-1\_1* Pflanzen (Abbildung 42, B). Dieser Phänotyp war bei regenerierten Pflanzen aus der Transformation mit EHA101 und *amiR-Ren3-1\_2* besonders gravierend (Abbildung 42, B). Zu diesem Zeitpunkt war jedoch noch keine Kontrolle der T-DNA Insertion mittels PCR möglich.

### III.4.2 Transformation von anfälligen Rebsorten mit *Ren3-1*

Für die Transformation von anfälligen Rebsorten mit dem Gen *Ren3-1* wurde dieses mit nativem Promotor amplifiziert (1 kb stromaufwärts des detektierten Transkriptionsstart von *Ren3-1* 5'3'RACE+RT-PCR) und ebenfalls in den Vektor pLH9070 kloniert. Mit diesem Pflanzentransformationsvektor wurde im Anschluss embryogenes Gewebe von 'Chardonnay' und 'Riesling' transformiert, welche anfällig gegenüber dem Echten Mehltau sind.

#### III.4.2.1 Amplifikation und Klonierung von *Ren3-1*

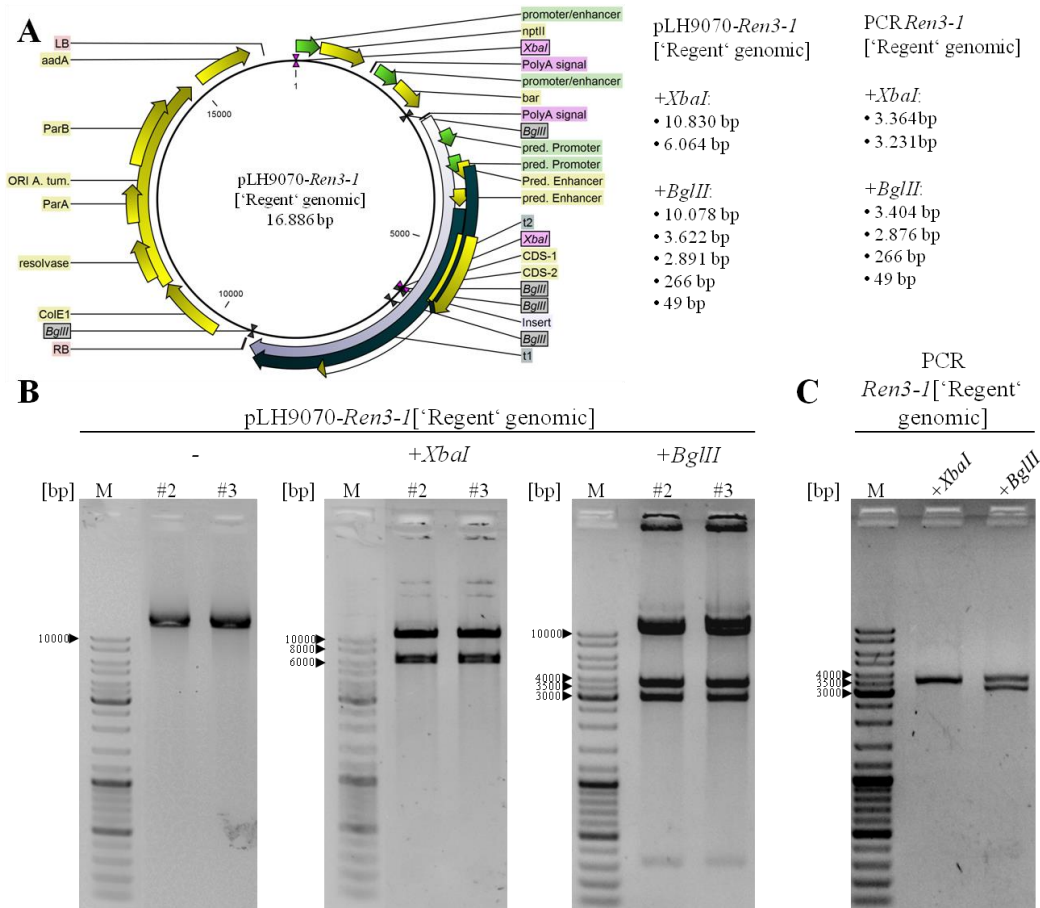
Für die Amplifikation von *Ren3-1* mit nativem Promotor, wurde der BAC-Klon H25C10 als Template verwendet. Der Bereich stromaufwärts der beiden identifizierten *Ren3-1* Transkripte wurde mithilfe von TSSPlant (Softberry) mit bekannten Promotorsequenzen abgeglichen. Dabei konnten zwei Promotorbereiche identifiziert werden. Zusätzlich konnten noch zwei Enhancer stromaufwärts des ersten Transkripts vorhergesagt werden (Abbildung 43, A). Der genomische Bereich von *Ren3-1* wurde mit den beiden flankierenden Oligonukleotiden **I** und **II** amplifiziert, über welche die homologen Sequenzen zum Zielvektor pLH9070 an die Enden des PCR-Fragmentes angefügt wurden (Abbildung 43, A und B). Das erwartete PCR-Fragment hatte eine Größe von 6578 bp was dem erhaltenen Signal der Gelelektrophorese zwischen 6000 und 8000 bp entsprach (Abbildung 43, B). Für die In-Fusion Klonierung wurde das Plasmid pLH9070-35SGFP wie in II.2.10.4.2 *In-Fusion Klonierung der R-Gene in pLH9070* beschrieben mit den beiden Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *EcoRI* linearisiert. Dabei wurde ein Fragment mit einer Größe von 10343 bp für den linearisierten Vektor erwartet.



**Abbildung 43:** A Schematische Darstellung der In-Fusion Klonierung. Homologe Sequenzen des zu inserierenden PCR-Fragments zum Zielvektor sind grün hinterlegt. Die beiden nachgewiesenen Transkripte von *Ren3-1* sind mit RNA (schwarz), mRNA (Türkis) und kodierenden Bereichen (gelb) eingezeichnet. Vorhergesagte Promotorbereiche (grün) und Enhancer (gelb) sind als Pfeile vor den Transkripten angegeben. B Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation des genomischen Bereichs von *Ren3-1*. C Gelelektrophorese von pLH9070-35SGFP vor und nach Inkubation mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *EcoRI* + *HindIII*.

Dieses Fragment konnte bei der Gelelektrophorese detektiert werden (Abbildung 43, C). Die beiden zusätzlichen Fragmente zwischen bei ca. 1250 und 800 bp waren die beiden erwarteten 1090 bp und 782 bp Fragmente (Abbildung 43, C). Dabei wurde ein Fragment mit einer Größe von 10343 bp für den linearisierten Vektor erwartet, welches bei der Gelelektrophorese detektiert werden konnte (Abbildung 43, C).

Der linearisierte Vektor und das PCR-Fragment wurden ausgeschnitten und aufgereinigt. Die In-Fusion Reaktion und die Transformation von *E. coli* Zellen wurde wie in II.2.10.4.2 *In-Fusion Klonierung der R-Gene in pLH9070* durchgeführt. Von zehn der erhaltenen Kolonien wurde eine Flüssigkultur angesetzt und eine Plasmidpräparation durchgeführt. Zwei der zehn positiven Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen näher untersucht (Abbildung 44). Plasmide der Klonen #2 und #3 wurden mit den beiden Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *BglII* inkubiert und das Schnittmuster anschließend durch eine Gelelektrophorese analysiert. Die durch *XbaI* erwarteten Fragmente waren deutlich zu erkennen (Abbildung 44, B).



**Abbildung 44:** **A** Schematische Darstellung des pLH9070-*Ren3-I* [‘Regent’ genomic] Plasmids. Die kodierenden Bereiche der auf dem Plasmid enthaltenen Gene sind in gelb eingezeichnet. Das *Ren3-I* Insert wurde in grau eingezeichnet. Zusätzlich sind die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *BglII* eingezeichnet. Die erwarteten Fragmente durch die Restriktionsendonukleasen sind neben dem Plasmid angegeben. **B** Gelelektrophoresen vor und nach Inkubation des pLH9070-*Ren3-I* [‘Regent’ genomic] Plasmids mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *BglII*. **C** Gelelektrophorese des *Ren3-I* [‘Regent’ genomic] PCR-Produkts nach Inkubation mit *XbaI* und *BglII*.

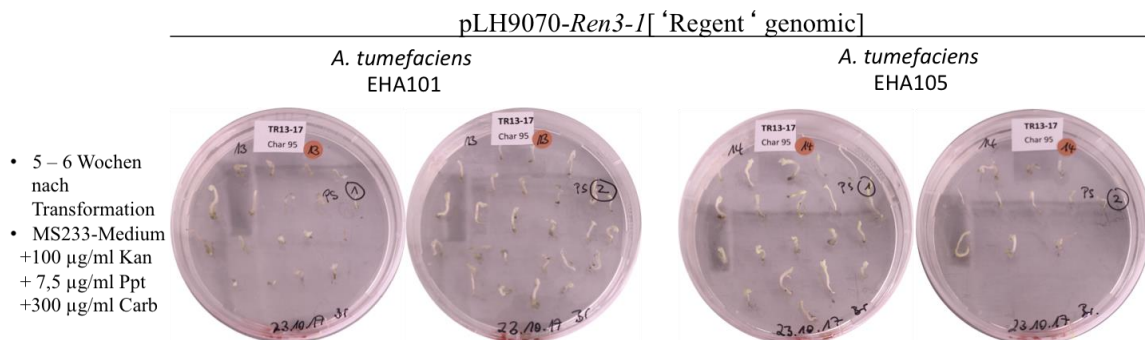
Die beiden Fragmente mit einer Größe von 266 und 49 bp nach Inkubation mit *BglII* waren jedoch nicht zu detektieren. Jedoch konnte ein Fragment mit einer Größe von rund 320 bp detektiert werden, welches mit den beiden Fragmenten zusammen korrelieren würde. Da die beiden Schnittstellen die zu den beiden kleinen Fragmenten führen würden sehr nah beieinander liegen, kann von einer partiellen Restriktion ausgegangen werden (Abbildung 44, B).

Zur Kontrolle wurde das amplifizierte *Ren3-I* [‘Regent’ genomic] PCR-Fragment ebenfalls mit den beiden Restriktionsendonukleasen inkubiert. Für *XbaI* war bei der Gelelektrophorese nur ein Fragment erkennbar, was daran lag, dass die beiden erwarteten Fragmente in etwa dieselbe Größe hatten (Abbildung 44, A und C). Die Annahme der Überlagerung der beiden Fragmente wird durch die Intensität des Signals für das detektierte Fragment bestätigt, welches um einiges stärker ist als die Fragmente durch die Inkubation mit *BglII*. Eine Gelelektrophorese des mit *BglII* inkubierten PCR-Fragments zeigte deutlich die beiden erwarteten großen Fragmente mit 3404 und 2876 bp (Abbildung 44, C). Die beiden kleinen

Fragmente waren hier aber nicht erkennbar, was an der Menge des eingesetzten PCR-Fragments liegt (Abbildung 44). Das Insert der beiden Plasmide wurde im Anschluss ansequenziert was die erfolgreiche Insertion des *Ren3-1*['Regent' genomic] PCR-Fragments in pLH9070 ebenfalls bestätigte (Abbildung 62).

#### III.4.2.2 Transformation von 'Chardonnay' und 'Riesling' mit pLH9070-*Ren3-1* ['Regent' genomic] und anschließende Selektion von transgenen Pflanzen

Mit dem Klon #2 wurde, wie auch schon für die pLH9070-35S-amiRNA Konstrukte, ein triparentales Mating durchgeführt um das Plasmid in die beiden Agrobakterien-Stämme EHA101 und EHA105 zu übertragen (s. II.2.10.5 Triparentales Mating für die Transformation von *A. tumefaciens*). Für die anschließende Transformation wurde embryogenes Gewebe von 'Chardonnay' und 'Riesling' verwendet. Bedingt durch den besseren Zustand des embryonalen Gewebes von 'Chardonnay' waren zu diesem Zeitpunkt nur regenerierte Embryonen von diesem Genotyp vorhanden. Die Transformation und Selektion wurde hier wie für die pLH9070-35S-amiRNA Konstrukte beschrieben durchgeführt.

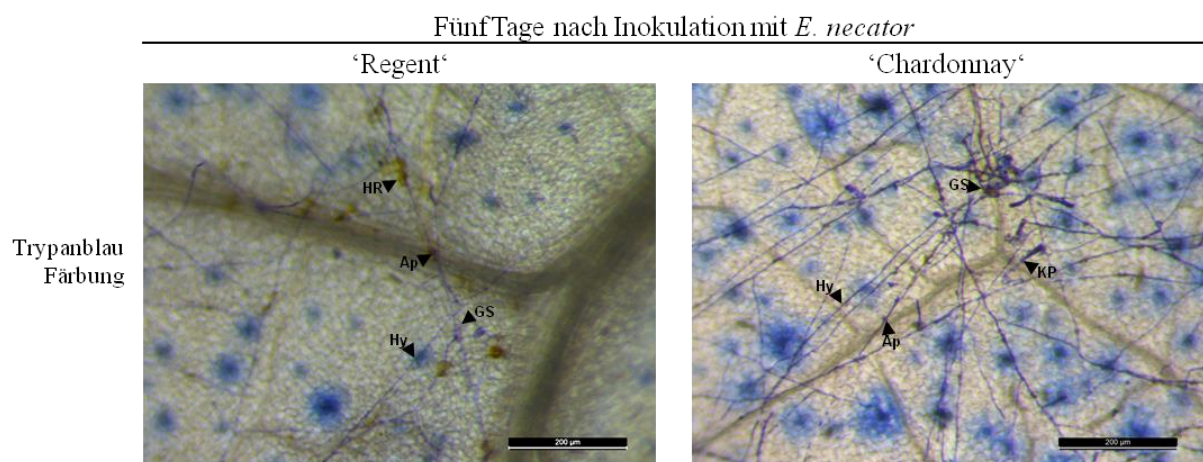


**Abbildung 45:** Bereits selektionierte Embryonen aus Zellkulturgewebe von 'Chardonnay' nach Transformation mit pLH9070 *Ren3-1*['Regent' genomic] mit den beiden Agrobakterienstämmen EHA101 und EHA105. (MS233 = Murashige & Skoog Medium M0233 (Duchefa), Kan = Kanamycin, Carb = Carbenicilin, Ppt = Phosphinothricin) (Von der Arbeitsgruppe Dr. Harst durchgeführte Arbeiten)

Da die Erstellung des Konstrukts pLH9070-*Ren3-1*['Regent' genomic] mehr Zeit in Anspruch genommen hat, konnte zu diesem Zeitpunkt noch keine regenerierten Pflanzen untersucht werden (Abbildung 45). Sobald jedoch aus den Embryonen in Abbildung 45 normal wachsende Pflanzen hervorgegangen sind müssen diese ebenfalls mittels PCR auf eine erfolgreiche Insertion der T-DNA in das Genom von 'Chardonnay' mit dem *Ren3-1*['Regent' genomic] PCR-Fragment getestet werden. Durch künstliche Inokulationen mit *E. necator* von erfolgreich transformierten Pflanzen kann dann im Anschluss ermittelt werden, ob diese mit einer HR durch die Anwesenheit von *Ren3-1* auf den Echten Mehltau Erreger reagieren. Die Beobachtung einer solchen Reaktion würde bestätigen, dass das Kandidatengen *Ren3-1* das Resistenz-vermittelnde Gen aus dem Resistenzlocus *Ren3* von 'Regent' darstellt.

### III.5 Genexpression von Resistenz-assoziierten Genen

Um einen Einblick in die differentielle Regulierung von Stoffwechselwegen zu erhalten wurde eine differentielle Genexpressionsanalyse nach Inokulation mit *E. necator* durchgeführt. Hierbei wurde 'Regent' als *Ren3/Ren9*-Träger und 'Chardonnay' als anfälliger Genotyp aus *in vitro* Kultur künstlich mit *E. necator* inokuliert. Für die Inokulation wurde Sporenmateriale verwendet, welches auf dem anfälligen Genotyp 'Lemberger' in der Klimakammer propagiert worden war (16 h Licht, 8 h dunkel, 60 % rH, 22 – 24 °C). Es wurden Blätter mit frischen Infektionen verwendet, bei denen eine bis zwei reife Sporen an den gebildeten Konidophoren unter einem Binokular zu erkennen waren. Dies entsprach etwa 15 – 20 Tage alten Infektionen. Bei den verwendeten *in vitro* Pflanzen handelte es sich um sechs bis acht Wochen alte Einaugenstecklinge, welche auf MS233 Medium vermehrt worden waren. Für die Analyse der differentiellen Genregulation wurden die oberen drei Blätter der Pflanzen mit einem Pinsel mit frischen Sporen inokuliert. Für die folgenden Untersuchungen wurden die Zeitpunkte 10, 24 und 48 Stunden nach Inokulation gewählt. Pro Zeitpunkt wurden drei biologische Wiederholungen durchgeführt, welche jeweils aus den drei inokulierten Blättern bestanden. Für den Zeitpunkt vor Inokulation wurden ebenfalls drei biologische Wiederholungen verwendet. Inokulierte Blätter wurden zu den definierten Zeitpunkten abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die RNA wurde wie in II.2.11 beschrieben aus den Proben extrahiert und in cDNA umgeschrieben (s. II.2.14.2). RT-qPCRs für die jeweiligen Gene wurden wie in II.2.15 beschrieben durchgeführt. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Inokulation wurden nach fünf Tagen inokulierte Blätter abgenommen, mit Trypanblau gefärbt und mikroskopiert (s. II.2.2.1).

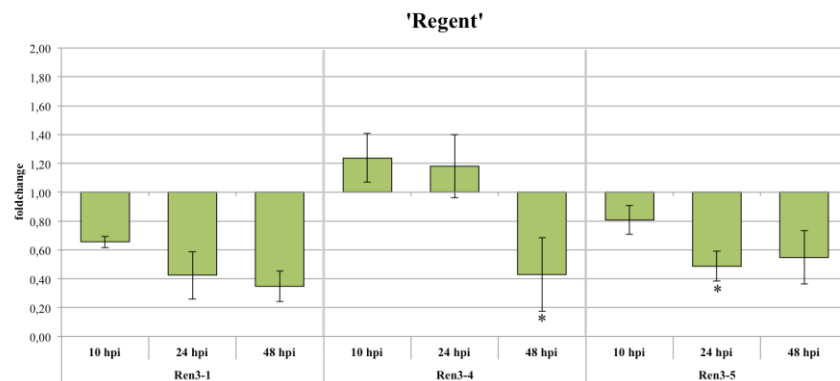


**Abbildung 46:** Trypanblau-gefärbte Blätter von 'Regent' und 'Chardonnay' fünf Tage nach Inokulation mit *E. necator*. (Ap = Appressorium, Hy = Hyphe, GS = gekeimte Spore, HR = Hypersensitive Reaktion, KP = Konidophor)

Es ist ein deutliches Wachstum von *E. necator* sowohl auf Blättern von 'Regent' als auch auf Blättern von 'Chardonnay' zu erkennen (Abbildung 46). Jedoch ist bei 'Regent' im Gegensatz zu 'Chardonnay', wie schon zuvor beschrieben, eine Braunfärbung der Zellen zu erkennen, welches assoziiert ist mit den gebildeten Appressorien des Pilzes (Abbildung 46).

### III.5.1 RT-qPCR zum Nachweis der Transkription der Kandidatengene aus *Ren3*

Um die Transkription der identifizierten Kandidatengene im Resistenzlokus *Ren3* nachzuweisen wurden RT-qPCRs für die jeweils vorhergesagten Gene durchgeführt.



**Abbildung 47:** Ergebnisse der RT-qPCR für die Kandidatengene *Ren3-1*, *Ren3-4* und *Ren3-5*. Es ist die relative Expressionsänderung (Foldchange) 8, 24, und 48 Stunden nach Inokulation mit *E. necator* aufgetragen. Die angegebenen Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der technischen Wiederholungen. (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$  ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$  ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ )

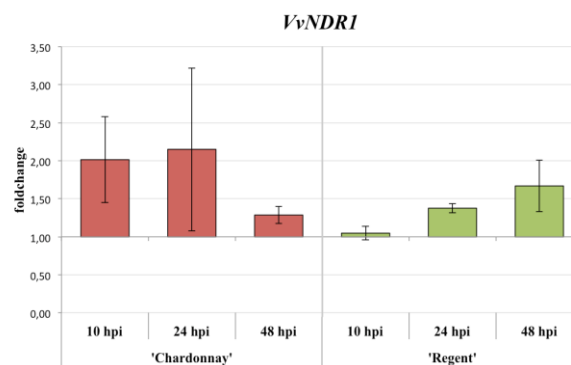
In Abbildung 38 sind die Expressionen der Kandidatengene *Ren3-1*, *Ren3-4* und *Ren3-5* dargestellt. Hierbei wurden nur die Expressionsdaten von 'Regent' dargestellt, da diese Gene exklusiv in diesem Genotyp transkribiert werden. Für *Ren3-1* und *Ren3-5* ist 10 Stunden nach Inokulation mit *E. necator* bereits eine verminderte Expression erkennbar die über die 24 und 48 Stunden nach Inokulation weiter abnimmt (Abbildung 47). Das Kandidatengene *Ren3-4* wird im Gegensatz dazu nach 10 und 24 Stunden schwach induziert und ist nach 48 Stunden wie die beiden anderen Gene stark reprimiert (Abbildung 47). Dieses Ergebnis widerspricht dem Ergebnis des LGRM+TD und der sequenzierten 5' , 3'RACE und CR-RT-PCR Klone. Eine Sequenzierung des RT-qPCR Amplicons zeigte jedoch, dass es sich dabei um *Ren3-4* aus dem Resistenzlokus *Ren3* handelt (Abbildung 63).

Für die beiden vorhergesagten Gene *Ren3-2* und *Ren3-3* konnte keine Amplifikation festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der LGRM+TD Analyse, in der keine Transkripte für diese beiden Gene vorhergesagt wurden.



### III.5.2 Differentielle Regulation von bekannten Genen stromabwärts von NBS-LRR Genen

Die beiden bekanntesten Gene der Signalweiterleitung nach Interaktion mit NBS-LRR Genen sind *NDR1* und *EDS1*. Es wurde beschrieben, dass das Gen *NDR1* bei der Vermittlung von Signalen durch CC-NBS-LRR Gene eine wichtige Rolle spielt. *EDS1* wurde dagegen fast ausschließlich mit TIR-NBS-LRR Genen in Verbindung gebracht (Coll *et al.*, 2011). Eine Ausnahme bildet dabei das CC-NBS-LRR Gen *HRT* aus *A. thaliana*, welches für seine Resistenzvermittlung auf *EDS1* zurückgreift (Yang *et al.*, 2014). Da es sich bei dem identifizierten RGA-Cluster im *Ren3* Locus um CC-NBS-LRR Gene handelt, wurde *VvNDR1* in einer RT-qPCR analysiert.



**Abbildung 48:** Ergebnisse der RT-qPCR für das Gen *VvNDR1*. Es ist die relative Expressionsänderung (Foldchange) 8, 24, und 48 Stunden nach Inokulation mit *E. necator* aufgetragen. Die angegebenen Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der technischen Wiederholungen. (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$ ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ )

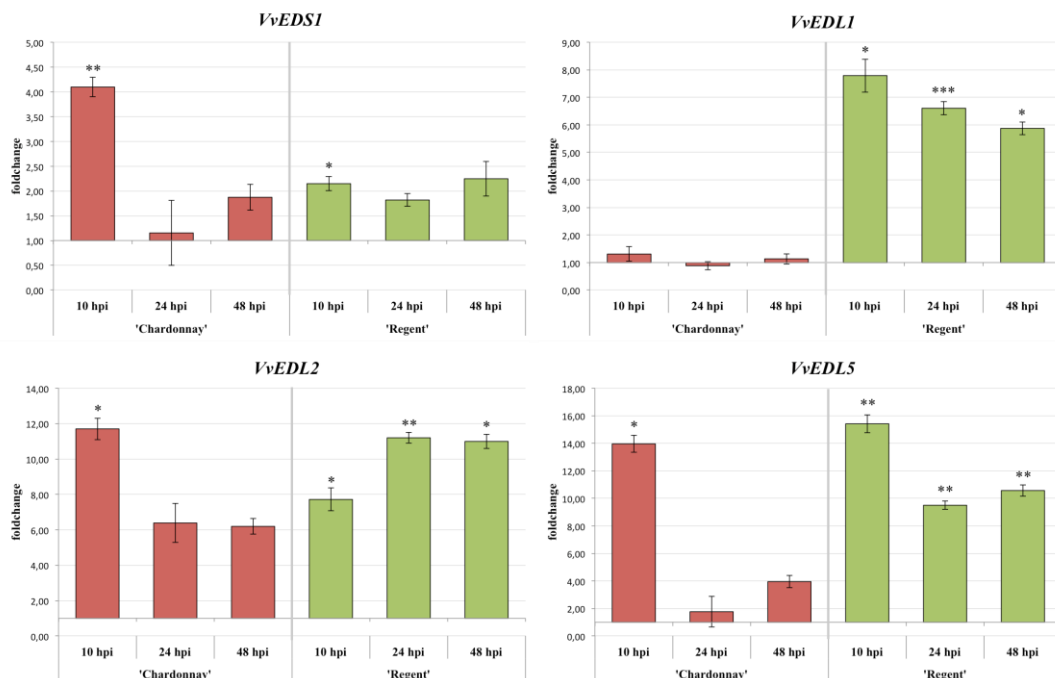
'Chardonnay' zeigt 10 und 24 Stunden nach Inokulation eine leichte Induktion von *VvNDR1* die jedoch durch den hohen Standardfehler nivelliert wird. Bei 'Regent' ist eine konstante Zunahme über die untersuchten Zeitpunkte zu erkennen. Jedoch ist die maximale relative Expression kaum über 1,5 (Abbildung 48).

Da *VvNDR1* nur geringfügig differentiell reguliert war, wurde im nächsten Schritt *EDS1* untersucht. Ein Knockout dieses Gens zeigte in *A. thaliana* eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einigen Pathogenen woher auch der Name „Enhanced Disease Susceptibility 1“ abgeleitet wurde (Dong, 1998). In der Weinrebe wurde mittlerweile ein Cluster aus mehreren *EDS1* und *EDS1-like* Genen auf Chromosom 17 bei ungefähr 8 Mb identifiziert (Gao *et al.*, 2010). Für die in Tabelle 11 aufgeführten Gene wurden jeweils RT-qPCR Analysen mit den darin publizierten RT-qPCR Oligonukleotiden durchgeführt (Gao *et al.*, 2010). In vorangegangenen Studien konnte bereits durch Komplementationsversuche mit *A. thaliana eds1* Mutanten gezeigt werden, dass es sich bei *VvEDS1* um das funktionelle Ortholog

handelt, welches durch Salizylsäure (SA) und durch Inokulation mit dem Echten Mehltau in 'Cabernet Sauvignon' induziert werden kann (Gao *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014a).

**Tabelle 26:** Übersicht der identifizierten *EDSI* und *EDSI-like* Gene mit ihrer Position auf Chromosom 17 (Gao *et al.*, 2010).

Gen	Annotation	Position	Strang
<i>VvEDSI</i>	VIT_217s0000g07560	17:8684860..8688219	-
<i>VvEDLI</i>	VIT_217s0000g07370	17:8371280..8373491	+
<i>VvEDL2</i>	VIT_217s0000g07375	17:8396485..8399109	+
<i>VvEDL5</i>	VIT_217s0000g07420	17:8498691..8501316	+



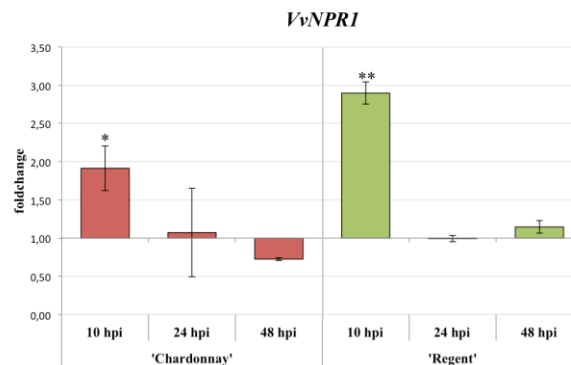
**Abbildung 49:** Ergebnisse der RT-qPCR für die Gene *VvEDSI*, *VvEDLI*, *VvEDL2* und *VvEDL5*. Es ist die relative Expressionsänderung (Foldchange) 8, 24, und 48 Stunden nach Inokulation mit *E. necator* aufgetragen. Die angegebenen Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der technischen Wiederholungen. (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$  ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ )

Eine Induktion der *VvEDSI*-ähnlichen Gene (*VvEDL*) durch SA konnte ebenfalls gezeigt werden (Gao *et al.*, 2014). In diesem Versuch wurde die Expression von *VvEDSI* und *VvEDLI*, 2 und 5 in den beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent' untersucht. Dabei konnte bei *VvEDSI*, *VvEDL2* und *VvEDL5* eine Induktion nach 10 Stunden und eine Repression 24 und 48 Stunden nach Inokulation mit dem Echten Mehltau von 'Chardonnay' festgestellt werden (Abbildung 49). Diese Repression war besonders stark bei *VvEDSI* und *VvEDL5* zu erkennen. Bei 'Regent' konnte für *VvEDSI* eine nahezu konstante Expression über die untersuchten Zeitpunkte festgestellt werden. Eine starke Induktion war bei *VvEDLI* in 'Regent' im Gegensatz zu 'Chardonnay' über alle Zeitpunkte zu erkennen (Abbildung 49). Dieses Gen war in vorangegangenen Studien mit 'Cabernet Sauvignon' und 'Norton' nicht

durch den Echten Mehltau induziert gefunden worden und eine Transkription konnte nur in den Wurzeln von 'Cabernet Sauvignon' nachgewiesen werden (Gao *et al.*, 2010, 2014). Für *VvEDL2* und 5 war in 'Regent' ebenfalls eine starke Induktion erkennbar, die im Gegensatz zu 'Chardonnay' bei *VvEDL2* weiter anstieg oder bei *VvEDL5* über die drei untersuchten Zeitpunkte konstant hoch blieb (Abbildung 49).

### III.5.3 Differentielle Regulation von *VvNPR1* und bekannten *PR*-Genen der Weinrebe

Als Resultat der Weiterleitung von biotischem Stress durch biotrophe Pathogene sind die sogenannten „Pathogenesis Related“ (*PR*) Gene reguliert durch „*NON EXPRESSOR OF PR GENES1*“ (*NPR1*) sehr gut untersucht und beschrieben. *NPR1* stellt einen wichtigen SA-Signalwandler dar, der durch die Interaktion mit TGA-Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung von den genannten *PR*-Genen beiträgt (Pieterse *et al.*, 2012).

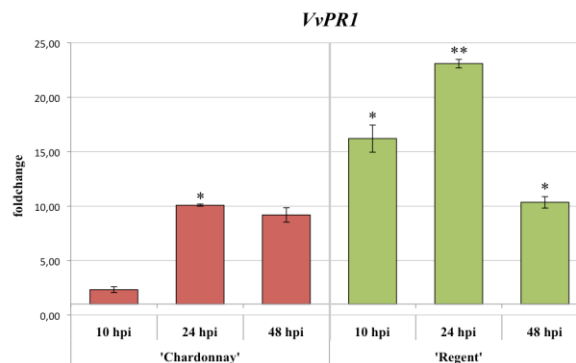


**Abbildung 50:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvNPR1* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$ ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ ).

Zehn Stunden nach Inokulation ist *VvNPR1* in 'Chardonnay' und 'Regent' induziert und wird dann 24 und 48 Stunden wieder reprimiert (Abbildung 50).

Für einige der untersuchten *PR* Gene konnte bereits eine differentielle Expression in 'Regent' nach Inokulation mit *E. necator* gezeigt werden (Welter *et al.*, 2017). Hier wurden die bekannten *PR* Gene *VvPRI* (VIT\_203s0088g00810), *VvPR5* (VIT\_202s0025g04290) und *VvPRI0.1* (VIT\_205s0077g1530) analysiert. Die drei untersuchten Gene werden durch Salizylsäure (SA) induziert, deren Akkumulation durch biotrophe Pathogene wie *E. necator* ausgelöst wird (Spoel & Dong, 2012). Diese Akkumulation wurde ebenfalls bereits mit einer Hypersensitiven Reaktion (HR) in Verbindung gebracht (Breen *et al.*, 2017; van Loon & van Strien, 1999). Für die beiden Gene *VvPRI* und *VvPR5* ist ein Export in die extrazelluläre Matrix vorhergesagt, wo die Interaktion mit dem Pathogen stattfindet. Für *PRI* wurde lange eine toxische Wirkung für Pilze und Oomyceten vermutet. Diese konnte durch die Inkubation

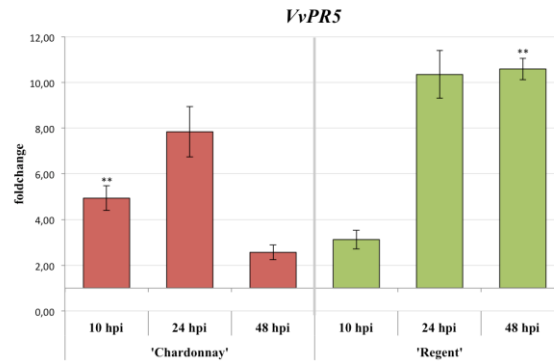
von Zoosporen von *Phytophthora infestans* mit dem aufgereinigten PR1 Protein aus Tabak nachgewiesen werden. Bei der Ko-Inokulation von Blattscheiben von Tabak mit Zoosporen und PR1 konnte gezeigt werden, dass 90 % der Zoosporen nicht in der Lage waren zu keimen (Niderman *et al.*, 1995).



**Abbildung 51:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvPRI* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$ ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ ).

Es sind klare Unterschiede in der Expression von *VvPRI* 10 und 24 Stunden nach Inokulation zwischen 'Chardonnay' und 'Regent' erkennbar. Bei 'Regent' schwankt die relative Expression zu diesen Zeitpunkten zwischen 16 und 23 verglichen mit dem Zeitpunkt vor der Inokulation (Abbildung 51). Alle drei untersuchten Zeitpunkte nach der Inokulation von 'Regent' zeigen einen signifikanten Unterschied in der Expression, wohingegen nur der Zeitpunkt 24 hpi bei 'Chardonnay' signifikant unterschiedlich war, was auf eine starke Schwankung in den biologischen Wiederholungen zurückgeführt werden kann (Abbildung 51). Zum Zeitpunkt 10 Stunden nach Inokulation ist eine geringe Expressionsänderung bei 'Chardonnay' im Gegensatz zu 'Regent' erkennbar. Erst nach 48 Stunden gleichen sich die beiden Genotypen in der Expression an (Abbildung 51).

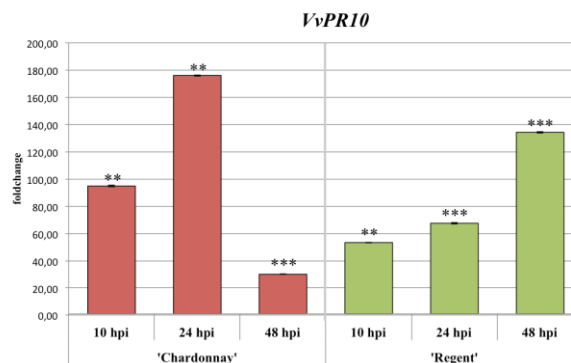
Bei dem untersuchten *VvPR5* handelt es sich um ein Gen, welches für ein Thaumatin-ähnliches Protein kodiert. Für dieses Protein wurde ebenfalls eine antifugale Wirkung nachgewiesen (Cheong *et al.*, 1997). Das Gen zeigte in vorangegangenen Studien in 'Regent' eine starke relative Expressionsänderung nach Inokulation mit *E. necator* (Welter *et al.*, 2017). Wie in Abbildung 52 zu erkennen ist unterscheiden sich die beiden untersuchten Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent' 24 und 48 Stunden nach Inokulation deutlich. Die relative Expression von 'Regent' liegt zu diesen Zeitpunkten zwischen 14 und 15 wohingegen die relative Expression in 'Chardonnay' kontinuierlich von etwa 6 (10 hpi) nach 2 (24 hpi) abflacht (Abbildung 52).



**Abbildung 52:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvPR5* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$ ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ ). Für den Zeitpunkt Regent 24 und 48 hpi wurden nur 2 biologische Wiederholungen bedingt durch jeweils einen Ausfall für die Berechnung verwendet.

Zum Zeitpunkt 10 Stunden nach Inokulation ist die Expression bei 'Chardonnay' höher als bei 'Regent' (Abbildung 52). Ein Test auf eine signifikante Expressionsänderung nach Inokulation verglichen mit dem Zeitpunkt vor Inokulation war nicht möglich, bedingt durch starke Schwankungen in den biologischen Wiederholungen.

Bei dem *VvPR10.1* kodierten Protein, handelt es sich im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten *PR*-Genen um ein im Zytoplasma lokalisiertes Protein, welches eine mögliche Ribonuklease und NTPase Aktivität besitzt (Lebel *et al.*, 2010). In vorangegangenen Studien gab es Hinweise, auf eine starke Expressionsänderung des Gens nach Inokulation mit *E. necator* für 'Regent' (Welter *et al.*, 2017).



**Abbildung 53:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvPR10* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$ ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ ).

Vergleicht man die beiden untersuchten Genotypen miteinander, so erkennt man, dass der anfällige Genotyp 'Chardonnay' eine stärkere Expressionsänderung 10 und 24 Stunden nach Inokulation mit dem Echten Mehltau aufweist (Abbildung 53). Diese flacht jedoch nach 48

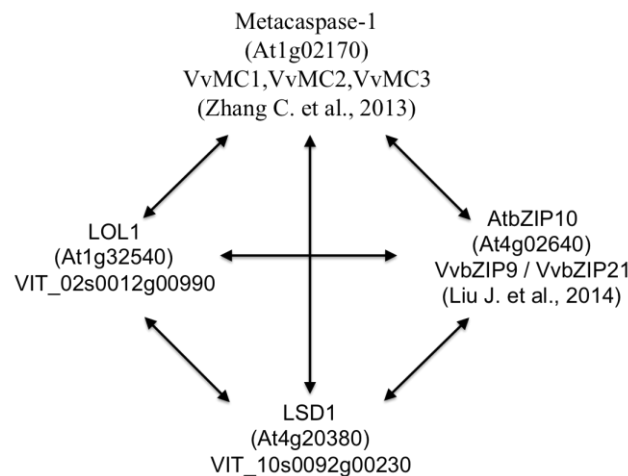
Stunden wieder ab. Die relative Expression von *VvPRI0* steigt dagegen bei 'Regent' kontinuierlich über die drei untersuchten Zeitpunkte an (Abbildung 53). Nach 48 Stunden weist 'Regent' eine mehr als vierfach so hohe Expression von *VvPRI0* auf verglichen mit 'Chardonnay' (Abbildung 53).

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse der *PR* Gene bestätigen somit die Ergebnisse der Mikroskopie. Es wurde eine erfolgreiche Inokulation der beiden Genotypen durchgeführt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass 'Regent' als resistenter Genotyp ein anderes Expressionsmuster aufweist, was zum einen auf eine schnellere (*VvPRI*) und eine länger andauernde (*VvPR5* und *VvPRI0.1*) Resistenzantwort hindeutet.

### III.5.4 Differentielle Regulation von bekannten Regulatoren der Hypersensitiven

#### Reaktion

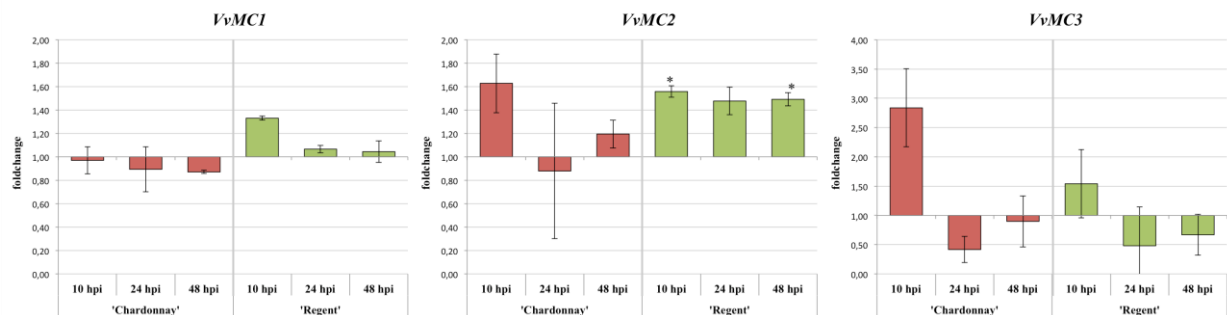
Da bereits für *Ren3* und *Ren9* nach Inokulation mit *E. necator* eine HR assoziiert mit den Appressorien des Pilzes in mikroskopischen Studien gezeigt wurde, wurden bekannte orthologe Regulatoren dieses Mechanismus aus der Weinrebe untersucht (Abbildung 46) (Zendler *et al.*, 2017).



**Abbildung 54:** Vereinfachte Darstellung des LSD1 „deathsomes“ aus *A. thaliana* (Coll *et al.*, 2011). Zusätzlich zu den Genen aus *A. thaliana* wurden die Orthologe der Weinrebe angegeben.

Eine Interaktion der gezeigten Proteine konnte sowohl in einer „Yeast Two Hybrid“ (Y2H) Analyse, als auch in genetischen Studien bestätigt werden (Coll *et al.*, 2010, 2011). Für die Metacaspase-1 aus *A. thaliana* waren bereits aus anderen Studien orthologe Gene bekannt (Zhang *et al.*, 2013). Insgesamt konnten in der Weinrebe sechs Gene mit einer hohen Ähnlichkeit zu den bekannten Metacaspasen aus *A. thaliana* identifiziert werden. Die Gene *VvMC1*, *VvMC2* und *VvMC3* wiesen dabei eine hohe Sequenzübereinstimmung mit *AtMC1* auf (Zhang *et al.*, 2013). Für *AtbZIP10* waren ebenfalls mögliche orthologe Gene in der

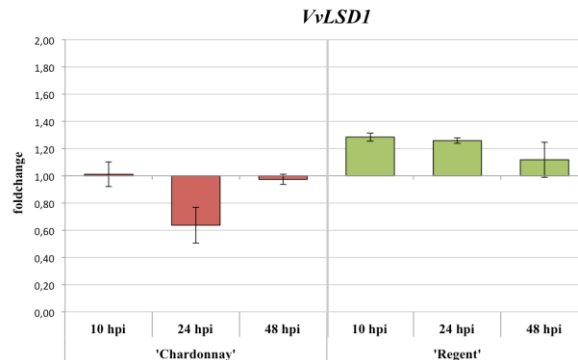
Weinrebe durch andere Studien bekannt. In einem phylogenetischen Stammbaum zeigten die Gene *VvbZIP9* und *VvbZIP21* die höchste Übereinstimmung mit *AtbZIP10* (Liu *et al.*, 2014). Für die Gene *LSD1* und *LOL1* waren keine Weinreben-Orthologe in der Literatur beschrieben. Deshalb wurden hier die möglichen orthologen Gene durch einen Vergleich mit *AtLSD1* und *AtLOL1* bei der Datenbank von „Gramene“ gesucht. Hierdurch konnte VIT\_210s0092g00230 (*LSD1* 54 % Identity) und VIT\_202s0012g00990 (*LOL1* 61 % Identity) als mögliche Orthologe identifiziert werden (Abbildung 54).



**Abbildung 55:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvMC1*, *VvMC2* und *VvMC3* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$ ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ ).

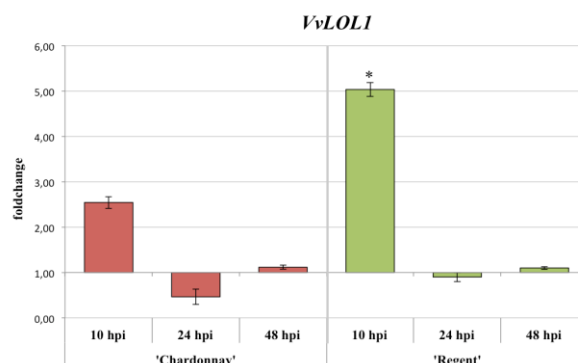
Die drei gezeigten Metacaspasen aus *V. vinifera* sind ebenfalls wie *AtMC1* Typ I Metacaspasen. *AtMC1* wurde in Studien mit doppel-knockout Mutanten von *A. thaliana*, bei denen *LSD1* und *MC1* durch T-DNA Insertion inaktiviert worden waren, als Positivregulator des programmierten Zelltods identifiziert (Coll *et al.*, 2010). Bei den hier analysierten Metacaspasen konnte bei *VvMC1* eine schwache Induktion bei 'Regent' 10 Stunden nach Inokulation festgestellt werden. *VvMC2* zeigte eine Induktion bei der Probe 10 hpi in 'Chardonnay'. Bei 'Regent' konnte hier eine konstante Induktion über alle drei untersuchten Zeitpunkte festgestellt werden. *VvMC3* zeigte einen „Foldchange“ (FC) von drei 10 Stunden nach Inokulation bei 'Chardonnay', wohingegen dieses Gen in 'Regent' nur schwach induziert wurde. Dieses Gen wurde bei beiden Genotypen in beiden folgenden Zeitpunkten reprimiert (Abbildung 55). Im Zuge der Analyse dieser drei Metacaspasen wurden ebenfalls *VvMC4*, *VvMC5* und *VvMC6* analysiert. *VvMC4* wurde hierbei in 'Chardonnay' stark reprimiert, wohingegen die Expression in 'Regent' über die drei Zeitpunkte in etwa gleich blieb. Bei den beiden Typ II Metacaspasen *VvMC5* und *VvMC6*, konnte, wie für *VvMC4*, eine starke Repression in 'Chardonnay' festgestellt werden und eine leichte Induktion 10 Stunden nach Inokulation in 'Regent' (FC 1,8). Für *VvMC6* war die Expression in beiden Genotypen ungefähr gleich. Bei beiden konnte eine Repression der Transkription 24 und 28 Stunden nach

Inokulation festgestellt werden (Abbildung 66). Erwähnenswert ist, dass alle sechs untersuchten Metacaspasen in 'Regent' eine schwächere basale Expression im Vergleich zu 'Chardonnay' aufweisen. *VvMC3*, *VvMC4* und *VvMC5* wiesen dabei die schwächste basale Expression auf (Abbildung 67).



**Abbildung 56:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvLSD1* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$ ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ ).

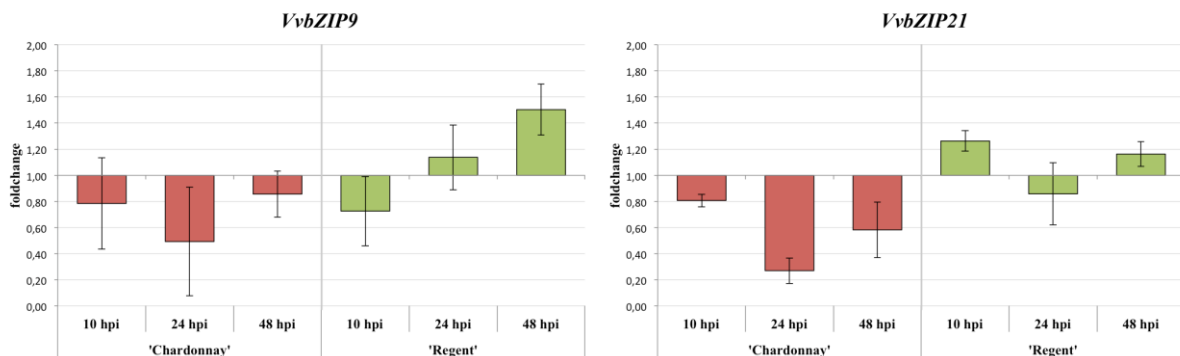
Das Gen *LSD1* (*LESION SIMULATING DISEASE RESISTANCE 1*) wurde in Pflanzen mit Knockout des selbigen charakterisiert. Diese Mutante zeigte spontane HR, die sich ungehindert auf Blättern ausbreitete und die nicht mit biotischem oder abiotischem Stress gekoppelt war (Lorrain *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass das Gen *LSD1* Pflanzen vor ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) induziertem Stress schützt, wodurch es bei *lsd1* Pflanzen zu der ungehinderten HR kommt (Coll *et al.*, 2011). In der RT-qPCR des möglichen *V. vinifera* Orthologs zeigte sich eine konstante Expression des Gens in 'Regent' wohingegen 24 Stunden nach Inokulation bei 'Chardonnay' eine Repression zu erkennen war (Abbildung 56).



**Abbildung 57:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvLOL1* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$ ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ ).



Das Gen *LOL1* (*LSD ONE LIKE1*) wurde zusammen mit *AtMCI* als Positivregulator des programmierten Zelltods (PCD) nachgewiesen. Eine Interaktion mit *LSD1* und *AtMCI* konnte ebenfalls in einer „Yeast Two Hybrid“ (Y2H) Analyse gezeigt werden (Coll *et al.*, 2011). Bei dem gefundenen Ortholog in *V. vinifera* konnte eine Induktion bei beiden untersuchten Genotypen 10 Stunden nach Inokulation festgestellt werden. Der FC bei 'Regent' war jedoch doppelt so hoch wie der bei 'Chardonnay'. Nach 24 Stunden erreicht die Expression dieses Gens bei beiden Genotypen wieder ihren basalen Wert (Abbildung 57).



**Abbildung 58:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvbZIP9* und *VvbZIP21* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$ ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ ).

Für *AtbZIP10* konnte wie auch schon für die vorhergegangenen Gene durch Y2H Analysen Interaktion mit *LSD1* gezeigt werden. Dieser Transkriptionsfaktor spielt nicht nur bei der R-Gen-vermittelten Resistenz, sondern auch in der basalen Resistenz eine Rolle. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung an *LSD1* eine Translokation in den Nukleus verhindert (Coll *et al.*, 2011). In *V. vinifera* wurde die Familie der bZIP Transkriptionsfaktoren näher untersucht wobei 55 Homologe identifiziert werden konnten. Die beiden Gene *VvbZIP9* und *VvbZIP21* zeigten bei einer phylogenetischen Analyse dieser Transkriptionsfaktoren die höchste Sequenzähnlichkeit zu *AtbZIP10* auf (Liu *et al.*, 2014). Bei 'Chardonnay' konnte für beide Gene eine Repression nach Inokulation mit *E. necator* festgestellt werden. 'Regent' zeigte einen kontinuierlichen Expressionsanstieg über die drei Zeitpunkte auf. *VvbZIP21* zeigte keine eindeutige Expressionsänderung bei 'Regent' (Abbildung 58).

Alles in allem kann gesagt werden, dass Unterschiede in der Expression zwischen dem resistenten Genotyp 'Regent' und dem anfälligen 'Chardonnay' festgestellt werden konnten. Jedoch waren die Expressionsänderungen dieser Gene relativ schwach. Das einzige Gen, welches in 'Regent' deutlich induziert wurde nach Inokulation mit *E. necator* war *VvLOL1*.

Da es sich hierbei um einen Positiv Regulator des PCD handelt, würde dies mit den Mikroskopie Ergebnissen von 'Regent', bei denen HR assoziiert mit den Appressorien des Pilzes nachgewiesen werden konnte, korrelieren. Ebenfalls zeigt der Transkriptionsfaktor *VvbZIP9* eine konstante Zunahme der Expression bei den drei untersuchten Zeitpunkten. Für die Metacaspasen waren die Ergebnisse leider nicht eindeutig. Jedoch ist der Umstand, dass diese Gene im Echten Mehltau resistenten Genotyp 'Regent' eine wesentlich geringere basale Expression verglichen mit dem anfälligen Genotyp 'Chardonnay' aufweisen, durchaus interessant.

## IV Diskussion

### IV.1 Feinkartierung der Resistenzloci *Ren3* und *Ren9* gegen den Echten Mehltau der Weinrebe in experimentellen Kreuzungspopulationen

Seit der ersten Publikation des Resistenzlokus *Ren2* gegen den obligat biotrophen Erreger des Echten Mehltaus der Weinrebe (*E. necator*) sind nun mehr als 16 Jahre vergangen (Dalbó *et al.*, 2001). In diesen knapp zwei Jahrzehnten konnten durch eine intensive Suche nach weiteren natürlich vorkommenden Resistenzen gegen dieses Pathogen 12 weitere Resistenz-assoziierte genomische Bereiche der Liste der bekannten Resistenzloci hinzugefügt werden ([www.vivc.de](http://www.vivc.de), Data on breeding and genetics, Table of Loci for Traits in Grapevine). Der Ursprung dieser natürlich vorkommenden spezifischen Resistenzen liegt zum Großteil im Genpool der nordamerikanischen Wildrebenarten. Die Erklärung für diesen Umstand liegt in der Jahrhunderte andauernden Co-Evolution dieser Wildreben mit dem Pathogen *E. necator*. Während dieser Co-Evolution fanden sowohl aufseiten des Wirts als auch aufseiten des Pathogens etliche genetische Anpassungen statt, die schlussendlich zu spezifischen Resistenzen aufseiten der Weinrebe gegen *E. necator* führten.

Ein großes Problem bei der Beschreibung dieser Loci zum Verständnis der darin vorhandenen Resistenzgene stellt die Eingrenzung der genomischen Bereiche dar, mit welchen diese Resistenzen durch QTL-Analysen assoziiert wurden. Meist umfassen die beschriebenen Bereiche mehrere Megabasen auf den jeweiligen Chromosomen, wodurch eine gezielte Suche nach möglichen Kandidatengen enorm erschwert wird. Die Eingrenzung der Resistenzloci ist weiterhin für Züchter von erheblichem Interesse, da bei der Züchtung von neuen resistenten Rebsorten der genomische Wildrebenanteil auf ein Minimum reduziert werden sollte, um mögliche negative Effekte z.B. auf den Wuchs und die Traubenbildung zu vermeiden. Ebenfalls wird die Weinqualität durch die in Wildreben vorkommenden Fehleraromen, wie zum Beispiel die Bildung von Methylantranilat oder Furaneol, negativ beeinflusst (Rapp & Engel, 1995; Rapp & Versini, 1996). Eng gekoppelte genetische Marker, also eine Eingrenzung auf ein minimales genomisches Intervall, bringen Vorteile, von denen somit nicht nur die Wissenschaft profitiert, indem die Suche nach Kandidatengen erleichtert wird. Weiter ist eine genaue Beschreibung des Resistenzphänotyps ein entscheidender Prozess, da hierdurch weitere Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Gene, welche die Immunreaktion auslösen, getroffen werden können. Für die meisten der heute bekannten Resistenzloci konnte mittlerweile eine lokal begrenzte Hypersensitive Reaktion (HR)

assoziiert mit den Appressorien des Pilzes nach Penetration der epidermalen Zellen der Wirtspflanze gezeigt werden. Dabei unterscheiden sich die Loci meist nur in der Geschwindigkeit und der Frequenz in der diese HR auftritt (Qiu *et al.*, 2015). Eine sogenannte Penetrationsresistenz gegen den Echten Mehltau der Weinrebe konnte bis jetzt nur bei Wildrebenarten der Gattung *Cissus* und *Parthenocissus* gezeigt werden (Feechan *et al.*, 2011). Die Charakterisierung des jeweiligen Resistenzmechanismus ist eine essenzielle Information für die Züchtung, da mittlerweile versucht wird, dauerhafte Resistenzen zu etablieren, indem mehrere der bekannten Resistenzloci in einem Genotyp vereint werden (Agurto *et al.*, 2017; Eibach *et al.*, 2007; Fresnedo Ramírez *et al.*, 2017). Sinnvoll wäre es von daher unterschiedliche Resistenzmechanismen zu kombinieren, sofern die genetischen Ressourcen dies zulassen.

Für den Resistenzlocus *Ren3* aus 'Regent', welcher bereits 2004 in einer Kreuzungspopulation aus 'Regent' x 'Lemberger' erstbeschrieben wurde, konnte nun eine solche detaillierte Charakterisierung durchgeführt werden (Fischer *et al.*, 2004; Welter *et al.*, 2007; Zendler *et al.*, 2017). Dieser Resistenzlocus ist ein wichtiger Bestandteil der heutigen Resistenzzüchtung. In Deutschland beruht die Resistenz gegen den Echten Mehltau bei neugezüchteten, zugelassenen pilzwiderstandsfähigen (PIWI) Rebsorten zu 100 % auf dem Resistenzlocus *Ren3* (Oliver Trapp, persönliche Mitteilung). Das Intervall von *Ren3* konnte erfolgreich durch Analyse von Genotypen mit Rekombination auf Chromosom 15 im Bereich des zuvor beschriebenen *Ren3* Locus auf ein Intervall von etwa 200 kb eingegrenzt werden (flankiert durch ScORGF15-02 ~9.1 Mb und ScORA7 ~9.3 Mb). Als Resistenzmechanismus konnte eine HR nach Inokulation mit *E. necator* gezeigt werden, die assoziiert ist mit den gebildeten Appressorien des Pilzes (Zendler *et al.*, 2017). Im Zuge dieser detaillierten Charakterisierung konnte ein weiterer Resistenzlocus beschrieben werden, welcher ebenfalls auf Chromosom 15 lokalisiert ist. Dieser neue Resistenzlocus der, die Bezeichnung *Ren9* erhielt, lag in einem Bereich zwischen 1.1 und 3.5 Mb bezogen auf das Referenzgenom PN40024 12Xv0 und war eingegrenzt durch die Marker CenGen7 (~1.1 Mb, Chr. 15) und GF15-53 (~3,5 Mb, Chr. 15) (Zendler *et al.*, 2017).

#### **IV.1.1 Erstellung von genetischen Karten in den untersuchten experimentellen Kreuzungspopulationen**

Um diese beiden Loci zu bestätigen und weiter zu analysieren wurden QTL-Analysen in weiteren, für Resistenz gegen den Echten Mehltau spaltenden, Kreuzungspopulationen von 'Regent' (heterozygot *Ren3*) x 'Cabernet Sauvignon' und GF.GA-47-42 (heterozygot *Ren3*) x 'Villard Blanc' (heterozygot *Ren3*) durchgeführt. Hierbei wurden für die aus 252 F1-

Individuen bestehende Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' und für die aus 151 F1-Individuen bestehende Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' jeweils eine neue genetische Karte von Chromosom 15, erstellt mit bereits etablierten SSR-Markern aus 'Regent' x 'Lemberger' (Zendler *et al.*, 2017). Die integrierte genetische Karte der beiden Kreuzungspopulationen umfasste hier sowie auch schon für 'Regent' x 'Lemberger' eine Länge von ungefähr 40 cM. Die integrierte Karte von GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' ist mit etwa 46 cM rund 6 cM länger als die von 'Regent' x 'Lemberger' und 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' (Zendler *et al.*, 2017, Sup. Figure 1). Die genetische Karte der 'Regent'-Haplophase des Chromosom 15 umfasst in 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' 25 cM, was sie etwa 15 cM kleiner macht als die berechnete Haplophase von 'Regent' in 'Regent' x 'Lemberger'. Dies kann durch die zusätzliche Integration des genetischen Markers VMC8G3.2 erklärt werden kann (Zendler *et al.*, 2017, Sup. Figure 1). Alles in allem entspricht die berechnete Reihenfolge der genetischen Marker in den neuen genetischen Karten ihrer physikalischen Lage im Referenzgenom PN40024 12Xv0 (Jaillon *et al.*, 2007).

Vergleicht man die parental genen Karten der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' so stellt man fest, dass die genetische Karte von 'Cabernet Sauvignon' (54,6 cM) mehr als doppelt so lang ist wie die von 'Regent' (25,3 cM) (Abbildung 13). Dies deutet auf eine rund 50 % geringere Rekombinationsfrequenz während der Bildung der Gameten im heterozygoten *Ren3/Ren9*-Träger 'Regent' hin. Vor allem im vorderen Teil von Chromosom 15, in welchem die beiden Resistenzloci *Ren9* und *Ren3* liegen, wird deutlich, dass die Rekombination stark eingeschränkt ist. In der genetischen Karte von 'Regent' sind die Abstände der Marker zueinander bis zu dem Marker GF15-02 um etwa die Hälfte geringer als bei 'Cabernet Sauvignon'. Die Abstände zwischen GF15-02 – VvIP33 und VvIP33 – VMDC4D9.2 dagegen sind wieder einheitlich (Abbildung 13). Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die introgressierten genomischen Wildrebenanteile in diesem Bereich sein. Da es sich bei der Meiose um homologe Rekombination durch Crossing over handelt, könnte vermutet werden, dass bedingt durch große Unterschiede in der genomischen Sequenz von *V. vinifera* und dem unbekanntem Wildreben-Resistenzdonor eine homologe Rekombination aus Mangel an homologen Sequenzen eingeschränkt ist. Die Auswertung der verwendeten SSR-Marker spricht für die Hypothese der stark unterschiedlichen genomischen Sequenzen. Marker, welche anhand des Referenzgenoms PN40024 12Xv0 erstellt wurden und eng mit Resistenz korreliert wurden, zeigten ein 0-Allel für die resistente Haplophase wie z.B. GF15-08, GF15-10, GF15-53 und GF15-56. Andere dagegen, die anhand von 'Regent' Sequenzdaten erstellt wurden, waren dominant für die resistente Haplophase wie z.B. GF15-

42, ScORA7 und ScORGF15 02 (Zendler *et al.*, 2017). Eingeschränkte Rekombination bei Rückkreuzungen nach Introgression von genomischen Bereichen von Wildarten konnte ebenfalls bei der Tomate gezeigt werden. Hier war bei Rückkreuzungen ebenfalls eine, bis zu 27 % geringere Rekombinationsfrequenz zu beobachten, was auf die introgressierten genomischen Bereiche zurückgeführt wurde (Chetelat *et al.*, 2000).

#### **IV.1.2 Auswertung der erhobenen Resistenzbonituren der experimentellen Kreuzungspopulationen**

Die Auswertung der erhobenen Resistenzbonituren für die jeweiligen Kreuzungspopulationen zeigte bei einer Teilung der Datensätze in resistent und anfällig anhand der vorhandenen Allele einen signifikanten Unterschied zwischen Genotypen mit Resistenz-assoziierten Allelen und anfälligen Genotypen (Abbildung 12, Abbildung 15). Bei der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' waren die Unterschiede nicht so deutlich wie bei 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon', was auf den Zeitpunkt der durchgeführten Bonitur zurückzuführen ist. Die dargestellten Bonituren von GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' wurden jeweils am Ende der Vegetationsperiode durchgeführt, also zum Zeitpunkt des höchsten Infektionsdrucks durch den Echten Mehltaus. Dies wird dadurch deutlich, dass die medianen Boniturnoten von resistenten und anfälligen Genotypen in den einzelnen Jahren entweder gleich sind (Abbildung 15, 2003, 2006) oder nur um eine Note auseinander liegen (Abbildung 15, 1999, 2000, 2005).

Um eine klare Unterscheidung der resistenten und anfälligen Genotypen zu erzielen wurden daher in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' mehrere Bonituren während der Vegetationsperiode 2016 durchgeführt. Die erste Bonitur wurde zu einem Zeitpunkt durchgeführt, an dem im Freiland bereits deutlich sichtbare Infektionen durch *E. necator* bei anfälligen Rebsorten erkennbar waren. Daraufhin wurden drei weitere Bonituren im Abstand von drei bis vier Wochen durchgeführt. Die letzte Bonitur entsprach dem Zeitpunkt des höchsten Infektionsdrucks. Bei den als anfällig klassifizierten F1-Individuen ist eine deutliche Verschiebung der vergebenen Boniturnoten über die vier Zeitpunkte von eins hin zu neun erkennbar (Abbildung 12). Bei *Ren3/Ren9*-tragenden Individuen liegt die mediane vergebene Note in den ersten drei Bonituren bei eins und erst bei der letzten Bonitur, also zum Zeitpunkt des höchsten Infektionsdrucks, verschiebt sich diese nach drei (Abbildung 12). Eine ähnliche Verteilung der Boniturnoten war ebenfalls in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Lemberger' zu erkennen, jedoch wurde hier nur zweimal in den Vegetationsperioden 2015 und 2016 bonitiert (Zendler *et al.*, 2017). Eine Einteilung anhand der vorhandenen Allele in resistent und anfällig der einzelnen F1-Individuen ist somit in den

beiden untersuchten Kreuzungspopulationen möglich und bestätigt die Ergebnisse, welche für 'Regent' x 'Lemberger' erhalten wurden (Zendler *et al.*, 2017).

#### **IV.1.3 QTL-Analyse für die Resistenz gegen den Echten Mehltau in den experimentellen Kreuzungspopulationen**

Die erhobenen Boniturdaten wurden anschließend mit den neu berechneten genetischen Karten der beiden Kreuzungspopulationen in einer QTL-Analyse miteinander verrechnet. Für beide Populationen konnten hierbei, wie erwartet, QTLs für Resistenz gegen den Echten Mehltau auf Chromosom 15 detektiert werden (Abbildung 14, Abbildung 15). Die Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' zeigt hierbei, wie auch schon bei 'Regent' x 'Lemberger' beobachtet, eine Verschiebung des QTLs zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Bonitur. Jedoch ist die Verschiebung, die hier beobachtet werden kann, invers zu der in 'Regent' x 'Lemberger' in der Vegetationsperiode 2015. Für das Jahr 2016 war der QTL für Resistenz gegen den Echten Mehltau in 'Regent' x 'Lemberger' zum Anfang von Chromosom 15 verschoben wie es auch für 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' ab der zweiten Bonitur der Fall war (Abbildung 14) (Zendler *et al.*, 2017). Die QTL-Analyse mit den Boniturdaten vom Anfang der Infektionsphase (Tabelle 16, Abbildung 14, *E.n.BI-2016-1*) lieferte für die hier untersuchte Kreuzungspopulation einen QTL, welcher mit einem Intervall, flankiert von den Markern UDV116 und ScORA7, assoziiert ist. Mit einem LOD-Wert von circa 12 und einer 23 % Erklärung der phänotypischen Varianz, ist dieser QTL eher schwach ausgeprägt (Tabelle 16). Dies beruht auf der Tatsache, dass zu diesem Zeitpunkt selbst Individuen, die keine mit Resistenz-assoziierten Marker aufwiesen, noch mit der Note eins bewertet wurden (Tabelle 15, Abbildung 15). In der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' konnte mit der Bonitur aus dem Jahr 2000 ebenfalls ein QTL für diesen Bereich berechnet werden. Durch die MQM-Analyse konnte das Intervall auf die Marker ScORA7 und GF15-41 eingegrenzt werden (Tabelle 20, Abbildung 17). Diese QTL Bereiche entsprechen dem beschriebenen *Ren3* Intervall auf Chromosom 15 aus 'Regent', welches wie schon beschrieben, auf das Intervall ScORGF15-02 und ScORA7 eingegrenzt werden konnte (Fischer *et al.*, 2004; Akkurt *et al.*, 2006; Welter *et al.*, 2007; van Heerden *et al.*, 2014; Zyprian *et al.*, 2016; Zendler *et al.*, 2017). Dieser QTL trat jedoch in 'Regent' x 'Lemberger' erst bei der zweiten Bonitur gegen Ende der Vegetationsperiode auf.

Für die drei weiteren Boniturzeitpunkte von 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' konnten jeweils QTLs detektiert werden, die zum Anfang von Chromosom 15 verschoben waren, was bei 'Regent' x 'Lemberger' bei den beiden frühen Bonituren in den Jahren 2015 und 2016 der Fall war (Zendler *et al.*, 2017). Die Bereiche konnten jeweils auf Intervalle von GF15-62 bis

CenGen6 und GF15-58 bis GF15-62 eingegrenzt werden (Tabelle 16). Die Bonituren *E.n.*Bl-2016-2 und -3 lieferten ähnliche LOD-Werte von ungefähr 40 und erklärten damit etwa 60 % der phänotypischen Varianz in der untersuchten Kreuzungspopulation (Abbildung 14, Tabelle 16). Diese QTLs waren jedoch im Gegensatz zu dem beschriebenen Intervall für *Ren9* (CenGen7 ~1,1 Mb – GF15-53 ~3,5 Mb) weiter an den Anfang von Chromosom 15 verschoben (GF15-62 ~0,9 Mb – CenGen6 ~1,1 Mb und GF15-58 ~0,2 Mb – GF15-62 ~0,9 Mb).

In der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' konnte ebenfalls in den Jahren 1999 und 2000 ein QTL im *Ren9*-Bereich detektiert werden. Durch MQM-Analysen konnte mit der Bonitur aus dem Jahr 1999 das Intervall auf den Bereich CenGen6 – GF15-10 eingegrenzt werden (Tabelle 20, Abbildung 17). Für die Bonitur 2000 war der QTL, nach durchgeführter MQM-Analyse, beschränkt auf den Marker CenGen6 (Tabelle 20, Abbildung 17). Dieser Bereich entspricht dem neu charakterisierten *Ren9* Locus auf Chromosom 15, welcher ebenfalls in anderen Arbeiten schon zu erkennen war (Fischer *et al.*, 2004; van Heerden *et al.*, 2014; Zyprian *et al.*, 2016; Zandler *et al.*, 2017).

Für die Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' konnten mit den Bonituren der Jahre 2005 und 2006 und einer MQM-Analyse ein weiterer QTL flankiert durch die Marker UDV116 und GF15-43 beschrieben werden, was ein Intervall von etwa 16 kb in der Sequenz von PN40024 12Xv0 darstellt (Tabelle 20, Abbildung 17). In flankierenden Bereichen zu diesem QTL konnten durch Sequenzannotationen bereits RGAs im Referenzgenom PN40024 12Xv0 identifiziert werden, welche typische funktionelle Domänen von Resistenzgenen in ihrer kodierenden Sequenz aufwiesen (CC, NBS, LRR) (Baggs *et al.*, 2017; Zandler *et al.*, 2017). Es besteht somit die Möglichkeit, dass hier ebenfalls in der resistenten Haplophase Gene kodiert sind, welche für die Resistenzvermittlung gegen den Echten Mehltau verantwortlich sind. Da dieser Bereich jedoch flankiert ist durch die beiden Resistenzloci *Ren3* und *Ren9* gestaltet sich eine separate Analyse schwierig. In allen untersuchten F1-Individuen konnte höchstens eine homologe Rekombination bei der Meiose auf Chromosom 15 detektiert werden. Für eine gezielte Analyse dieses Bereichs müssten somit Kreuzungen mit F1-Individuen durchgeführt werden, welche bereits durch ein Rekombinationsereignis einen der beiden Resistenzloci auf Chromosom 15 verloren haben.

Insgesamt konnten durch diese Analysen der beiden experimentellen Kreuzungspopulationen die beiden bekannten Resistenzloci *Ren3* und *Ren9* bestätigt werden. Durch die zeitlich unterschiedlich durchgeführten Bonituren für Resistenz gegen den Echten Mehltau konnte ebenfalls wie auch schon für 'Regent' x 'Lemberger' eine Verschiebung des QTLs beobachtet



werden, die jedoch invers zu der Verschiebung in 2015 in 'Regent' x 'Lemberger' war (Zendler *et al.*, 2017). Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Vorhandensein von unterschiedlichen *E. necator* Stämme im Freiland mit einer zeitlich unterschiedlichen Abundanz. Es liegt die Vermutung nahe, dass die beiden Resistenzloci *Ren3* und *Ren9* Resistenz gegen unterschiedliche Stämme von *E. necator* vermitteln. Somit könnte die Möglichkeit bestehen, dass in den Jahren 2015 und 2016, zu Beginn der Infektionsphase, unterschiedliche Varianten von *E. necator* im Freiland abundanter waren. Für Europa wurden bereits die beiden unterschiedlichen Stämme EU A und B charakterisiert (Frenkel *et al.*, 2012). Jedoch wurde hier keine jahreszeitliche Verteilung der Stämme untersucht. Weitere Analysen der *E. necator* Populationsstruktur mithilfe von SSR-Markern am Standort JKI Geilweilerhof, Siebeldingen, lassen die Vermutung zu, dass es sich jedoch um weit mehr als nur zwei unterschiedliche Stämme handelt (Doreen Adam, Masterarbeit 2015, AG Zyprian).

Der QTL für *Ren9* bei 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' war bei den durchgeführten Analysen weiter an den Anfang von Chromosom 15 verschoben im Gegensatz zu 'Regent' x 'Lemberger', was wahrscheinlich die Folge von fehlenden Rekombinanten F1-Individuen im Bereich von GF15-58 bis CenGen6 war. Die beiden QTLs der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' für *Ren9* lagen in dem beschriebenen Intervall von CenGen7 bis GF15-53 (van Heerden *et al.*, 2014; Zendler *et al.*, 2017). Mit der Bonitur aus dem Jahr 1999 könnte der Bereich von *Ren9* (~2,5 Mb) auf ein Intervall von etwa ~0,8 Mb eingegrenzt werden.

Die Kopplung des Resistenzlokus *Ren3* mit den bereits beschriebenen genetischen Markern ScORA7 und GF15-42 konnte erneut bestätigt werden (Akkurt *et al.*, 2006; Welter *et al.*, 2007; Zendler *et al.*, 2017; Zyprian *et al.*, 2016). Das ~200 kb Intervall dieses Locus konnte jedoch durch diese Analysen nicht weiter eingegrenzt werden.

#### **IV.1.4 Eingrenzung des Resistenzlokus *Ren9* durch rekombinante F1-Individuen aus unterschiedlichen experimentellen Kreuzungspopulationen**

Da die QTL-Analysen in den beiden experimentellen Kreuzungspopulationen nicht zum gewünschten Ziel der Eingrenzung des Resistenzlokus *Ren9* beigetragen haben, wurden im Anschluss F1-Individuen aus unterschiedlichen Kreuzungen zur Pyramidisierung der Resistenzloci *Run1* und *Ren3/Ren9* untersucht. Es wurde hierbei ein Satz aus F1-Individuen generiert, welche nach einer SSR-Marker-Analyse Rekombinationen auf Chromosom 15 aufwiesen. Des Weiteren wurden nur F1-Individuen verwendet, welche keine *Run1*-korrelierten Allele aufwiesen. Dieser Echte Mehltau Resistenzlokus liegt zusammen mit dem Falschen Mehltau Resistenzlokus *Rpv1* auf Chromosom 12 und stammt aus *M. rotundifolia*

(Feechan *et al.*, 2013). Mit dem aus 35 F1-Individuen bestehenden Set wurde eine SSR-Marker-Analyse durchgeführt mit den beschriebenen SSR-Markern aus 'Regent' x 'Lemberger' (Zendler *et al.*, 2017). Zusätzlich wurden noch InDel-Marker für die Analyse dieser Individuen generiert, welche im vermuteten Bereich von *Ren9* lagen. Die erhaltenen Allel-Kombinationen wurden als doppel haploid ausgewertet, da die mit Resistenz-assoziierte Haplophase in allen Individuen gleich ist. Diese Daten wurden verwendet, um eine genetische Karte zu generieren mit der im Anschluss eine QTL-Analyse durchgeführt wurde. Die F1-Individuen wurden wie zuvor für die beiden experimentellen Kreuzungspopulationen, ebenfalls anhand ihrer Allel-Kombinationen in resistente und anfällige Genotypen aufgeteilt. Ein Vergleich von Individuen mit und ohne Resistenz-assoziierten Allelen zeigte, wie auch schon bei den Kreuzungspopulationen 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' und GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc', einen signifikanten Unterschied zwischen phänotypisch resistent und anfällig klassifizierten F1-Individuen (Abbildung 18). Der Unterschied zwischen *Ren9*- und *Ren3/Ren9*-tragenden F1-Individuen war jedoch nicht signifikant (Abbildung 18).

Die QTL-Analyse mit der genetischen Karte basierend auf der resistenten Haplophase und den erhobenen Boniturdaten lieferte nach der MQM Analyse einen QTL, welcher die beiden Marker Indel-7 und GF15-10 umfasste (Abbildung 19). Die durchgeführte Kruskal-Wallis Analyse zeigte ebenfalls eine hochsignifikante Kopplung der Marker GF15-10, Indel-7 und GF15-08 mit dem Merkmal Resistenz gegen den Echten Mehltau (Abbildung 10). Trypanblau-Färbungen von Blättern der Individuen 2015-097-0014 und 2015-097-0921, welche mit dem Echten Mehltau infiziert worden waren, zeigten, wie bereits für *Ren9* beschrieben, HR assoziiert mit den Appressorien des Pilzes für das Individuum 2015-097-0014, welche bei dem untersuchten Individuum 2015-097-0921 nicht erkennbar war (Abbildung 20) (Zendler *et al.*, 2017). Zusammen mit den durch die SSR-Marker-Analyse festgestellten Rekombinationen der beiden Individuen konnte durch diese Beobachtung der Bereich für den Resistenzloкус *Ren9* auf ein Intervall zwischen den Markern Indel-7 und GF15-08 eingegrenzt werden (Abbildung 20). Dieses Intervall entspricht etwa 300 kb bezogen auf das Referenzgenom PN40024 12Xv0 und liegt in dem zuvor beschriebenen Intervall von CenGen7 – GF15-53 aus 'Regent' x 'Lemberger' (Zendler *et al.*, 2017). Für die „Marker Assisted Selection“ (MAS) in der Züchtung, sollten wie schon beschrieben, die flankierenden Marker CenGen6 und G15-53/GF15-54 verwendet werden, da sie in den untersuchten Kreuzungspopulationen als vollinformative Marker ausgewertet werden konnten (Tabelle 19) (Zendler *et al.*, 2017).

Durch die Eingrenzung dieses Resistenzlokus wurde die Grundlage geschaffen, diesen Bereich mittels BAC-Klonen zu sequenzieren. Flankierende BAC-Klone zu diesem Lokus konnten bereits sequenziert werden. Sie wiesen jedoch nur geringe Unterschiede zum Referenzgenom PN40024 12Xv0 auf (Schneider und Zyprian, unveröffentlicht). Ein erneutes BAC Bank Screening muss mit neuen genetischen Markern für diesen Bereich durchgeführt werden. Die beiden Marker GF15-10 und GF15-08 sind hierfür nicht geeignet, da sie jeweils ein 0-Allel für die resistente Haplophase liefern. Somit müssen weitere genetische Marker für den identifizierten Bereich generiert werden auf Basis der vorhandenen NGS-Daten von 'Regent' (Hausmann, unveröffentlicht).

Um in der Zukunft nachweisen zu können, ob die beiden Resistenzloci *Ren3* und *Ren9* zusammen einen additiven Effekt aufweisen muss eine Untersuchung von F1-Individuen mit den Kombinationen *Ren9*, *Ren3* und *Ren9/Ren3* durchgeführt werden. Zusätzlich zu den visuellen Bonituren der gesamten Pflanze, müssen artifizielle Inokulationsversuche durchgeführt werden, bei denen die Frequenz und Geschwindigkeit der gebildeten HR bezogen auf die jeweilige Kombination der Resistenzen im Detail studiert wird.

## **IV.2 Identifikation von Resistenzgenanaloga im eingegrenzten QTL-Bereich von *Ren3***

Der Resistenzlokus *Ren3* konnte bereits auf ein Intervall von rund 200 kb eingegrenzt werden. Diese Eingrenzung ermöglichte eine BAC-Klon Selektion und anschließende Sequenzierung von positiven BAC-Klonen. Auf einem der selektierten und sequenzierten BAC-Klone, welcher mithilfe des genetischen Markers ScORA7 identifiziert worden war, konnte durch Sequenzannotationen ein Cluster aus vier CC-NBS-LRR Genen identifiziert werden (Akkurt, Schneider, Zyprian, unveröffentlicht). Wie schon beschrieben konnte in mehreren Vorarbeiten gezeigt werden, dass der genetische Marker ScORA7 eng mit Resistenz gegen den Echten Mehltau der Weinrebe gekoppelt ist (Akkurt *et al.*, 2006; Welter *et al.*, 2007; Zandler *et al.*, 2017). Ein Cluster der beschriebenen CC-NBS-LRR Gene in der Nähe dieses genetischen Markers ist somit ein interessanter Befund (Abbildung 22, Tabelle 21). Diese RGAs oder auch R-Gene (Resistenz-Gene), konnten bereits in anderen Arbeiten, Pflanzenspezies-übergreifend mit Resistenz gegen etliche unterschiedliche Pathogene assoziiert werden. Diese Gene wurden in das „Gen-für-Gen Modell“ eingeordnet, bei dem davon ausgegangen wird, dass ein R-Gen (Avirulenz Gen, *Avir*) einen Effektor des Pathogens (Virulenz Gen, *Vir*) oder den Effekt des Effektors auf überwachte Proteine detektieren und eine Änderung der

Transkription von Resistenz-assoziierten Genen verursachen kann (Baggs *et al.*, 2017; Sekhwal *et al.*, 2015).

Am besten kann die Entstehung solcher spezifischer Resistenzen, die ergänzend zu der basalen Immunität der Pflanzen zu finden sind, durch das „Zig-Zag-Model“ von Jones & Dangl, 2006 erklärt werden. Zuerst ist ein Pathogen mit der basalen Immunität der Pflanze konfrontiert, die auf der Erkennung von MAMPs („microbe associated molecular patterns“) und DAMPs („damage associated molecular patterns“) beruht (Choi & Klessig, 2016; Jones & Dangl, 2006; Nishimura & Dangl, 2010; Spoel & Dong, 2012). Eines der bekanntesten MAMPs stellt dabei *flg22*, ein aus 22 Aminosäuren bestehendes Peptid-Epitop des bakteriellen Flagellins dar, welches bei allen begeißelten Bakterien vorzufinden ist (Choi & Klessig, 2016; Jones & Dangl, 2006; Sekhwal *et al.*, 2015). DAMPs sind meistens Bestandteile der Zellwand wie zum Beispiel Pektin-Fragmente die durch sekretierte, hydrolytische Enzyme der Mikroorganismen entstehen bei dem Versuch, in die Wirtszelle einzudringen (Choi & Klessig, 2016). Durch die Erkennung dieser einfachen, aber meist omnipräsenten generellen Muster können Pflanzen bereits ein breites Spektrum von Mikroorganismen erkennen und abwehren. Diese basale Immunität der Pflanze ist eine wirkungsvolle erste Barriere, wenn man bedenkt, dass Pflanzen mit etlichen Mikroorganismen konfrontiert sind, von denen jedoch nur ein winziger Bruchteil virulent ist und die Pflanze erfolgreich befallen kann. Dadurch, dass Pflanzen über keine mobilen Zellen wie die Lymphozyten bei Tieren verfügen, ist jede Zelle der Pflanze darauf angewiesen, Pathogene zu erkennen und die Immunreaktion auszulösen. Realisiert wird dies über RLKs („receptor like kinases“) und RLPs („receptor like proteins“), die meist transmembran eingelagert sind und somit für eine Signalvermittlung von extrazellulär nach intrazellulär ermöglichen. RLKs und RLPs erkennen dabei die MAMPs und DAMPs wodurch zumeist Heterodimerisierungen mit anderen Proteinen und Kinasen stattfinden, die durch komplexe Transphosphorylierungen „downstream“ lokalisierte Signalkaskaden wie zum Beispiel die MAPK Kaskade („mitogen activated protein kinase“) aktivieren. Diese wiederum interagieren mit Transkriptionsfaktoren der WRKY Familie, wodurch eine differentielle Genexpression bewirkt wird (Sekhwal *et al.*, 2015; Spoel & Dong, 2012). Diese basale Art der Immunität der Pflanzen wird auch als MTI („MAMP triggered immunity“) bezeichnet.

Einige wenige pathogene Mikroorganismen haben es jedoch durch Inhibierung der RLPs und RLKs geschafft, diese basale Immunität der Pflanze zu umgehen. Hierfür werden sogenannte Effektoren sekretiert, die meist die Inhibierung der Signalweiterleitung übernehmen. Über diese Effektoren ist jedoch noch wenig bekannt und über die genaue Wirkungsweise kann

daher meist nur gemutmaßt werden. Jedoch setzt genau an diesem Punkt die zweite Ebene der Immunität der Pflanzen an. Für diese spezialisierten Pathogene konnten durch Co-Evolution ETIs („effector triggered immunity“) entwickelt werden, wobei spezifische Proteine, meist mit Kinase-Aktivität ausgestattet, diese Effektoren erkennen und wiederum die „downstream“ geschalteten Signalkaskaden aktivieren. Die wohl bekanntesten Vertreter dieser R-Gene sind dabei die NBS-LRR Gene, welche anhand ihrer N-terminalen funktionellen Domänen in zwei Klassen eingeteilt werden können. Unterschieden wird zwischen CC-NBS-LRR und TIR-NBS-LRR Genen. Die CC Domäne entspricht dabei der bekannten Leucin-Zipper Domäne bekannt aus der Familie der bZIP Transkriptionsfaktoren. Die TIR Domäne weist Ähnlichkeit zu den transmembranen Interleukin-1 Rezeptoren auf, die bei Tieren dafür bekannt sind, eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität zu spielen. Für manche dieser Genprodukte in Pflanzen konnte ebenfalls eine Kopplung an die Plasmamembran oder an endosomale Membranen über andere transmembrane Proteine gezeigt werden (Heidrich *et al.*, 2011). Diese spezifischen Resistenzgene wurden bereits in einigen Pflanzenarten mit der direkten Erkennung von Effektoren oder der indirekten Erkennung der Effekte von Effektoren auf überwachte pflanzeigene Proteine („Guardee“, Guard Hypothesis) assoziiert. Die Erkennung des Pathogen durch diese Art von Proteinen führt in vielen, aber nicht allen Fällen zu einer HR (Ellis & Jones, 2003; Nishimura & Dangl, 2010; Lee & Yeom, 2015; Sekhwal *et al.*, 2015). In der Rebe konnten, wie bereits oben aufgeführt, um die 12 natürliche Resistenzen gegen den Echten Mehltau der Weinrebe identifiziert werden ([www.vivc.de](http://www.vivc.de)). Dabei ist für alle bekannten Resistenzloci außer *Ren8* und *Ren10* eine HR nach Infektion mit dem Echten Mehltau beschrieben (Pap *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2015; Zandler *et al.*, 2017).

Für vier der beschriebenen Resistenzloci konnte der Bereich auf den jeweiligen Chromosomen soweit eingegrenzt werden, um gezielt nach möglichen Kandidatengenen zu suchen. Dabei wurden jeweils Cluster von sogenannten CC/TIR-NBS-LRR Genen identifiziert, die hohe Sequenzähnlichkeit jeweils zueinander aufweisen. Diese Cluster entstanden deshalb höchst wahrscheinlich durch Genduplikation (Nishimura & Dangl, 2010). Der Resistenzloкус *Run1/Rpv1* wurde bereits soweit eingegrenzt, dass eine funktionelle Analyse der Kandidatengene möglich war. Anfällige Genotypen die entweder mit dem Gene *MrRUN1* oder *MrRPVI* transformiert wurden, zeigten danach Resistenz gegen den Echten bzw. Falschen Mehltau (Feechan *et al.*, 2013). In Abbildung 24 ist ein phylogenetischer Stammbaum der identifizierten Resistenzgenanaloga dargestellt, welcher aus einem Alignment der genomischen Sequenzen der identifizierten Gene erstellt wurde. Wie zu erwarten war, wurden die identifizierten RGAs durch ihre hohe Sequenzähnlichkeit

zueinander jeweils in „Subtrees“ gerechnet. Dabei ist zu erkennen, dass der Locus *Ren1* die größte genetische Distanz zu den drei anderen Resistenzloci aufweist. Dies könnte durch den Ursprung dieses Locus erklärt werden. *Ren1* ist der einzige Resistenzlocus, welcher seinen Ursprung in *V. vinifera* hat (Abbildung 24) (Coleman *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2008). Bei den drei anderen Resistenzloci handelt es sich um Introgressionen aus Wildreben. Bei den Genen des Resistenzlocus *Ren2* handelt es sich um *Rpm1*-ähnliche Gene die in einem Cluster von etwa 35 kb auf Chromosom 14 liegen (Cadle Davidson *et al.*, 2016). *Rpm1* vermittelt Resistenz gegen *Pseudomonas syringea* in *A. thaliana* und ist eines der bekanntesten R-Gene, welches bereits 1995 kloniert und sequenziert wurde (Grant *et al.*, 1995; Spoel & Dong, 2012). Für das Alignment und die Berechnung des phylogenetischen Stammbaums wurden hier jedoch nur die Sequenzdaten des Referenzgenoms verwendet, da die Gene aus *V. cinerea* 'Illinois547 1' noch nicht bekannt sind. Der Resistenzlocus *Ren1* setzt sich aus einem Cluster aus acht CC-NBS-LRR und einem NBS-LRR zusammen. Dieser Resistenzlocus hat den ungewöhnlichen Ursprung in *V. vinifera*, von welcher eigentlich ausgegangen wird, dass sie keine spezifischen Resistenzen gegen den Echten Mehltau besitzt. Der Locus wurde in der Rebsorte 'Kishmish Vatkana' identifiziert und mittlerweile konnte der Bereich möglicherweise auf eines der neun Gene eingegrenzt werden (Cadle Davidson *et al.*, 2016; Coleman *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2008).

Im sequenzierten Bereich von *Ren3* konnten vier mögliche R-Gene identifiziert werden, die bis auf *Ren3-3*, welches ein NBS-LRR Gen darstellt, vom Typ CC-NBS-LRR sind (Abbildung 22, Tabelle 21). Im phylogenetischen Stammbaum zeigt sich, dass die Gene *Ren3-1*, *Ren3-2* und *Ren3-3* nur geringe Unterschiede zu den Homologen im Referenzgenom PN40024 12Xv0 aufweisen. *Ren3-4* dagegen weist größere Unterschiede auf (Abbildung 24). Außerhalb des QTL Bereichs von *Ren3* konnte ein weiteres Gen vom Typ TIR-NBS-LRR identifiziert werden, welches durch die TIR Domäne eine höhere Sequenzähnlichkeit mit den Genen des *Run1/Rpv1* Locus aufweist. Die Unterschiede zum Referenzgenom-Homolog sind jedoch wie bei *Ren3-1*, *Ren3-2* und *Ren3-3* eher gering (Abbildung 24). *Ren3-5* liegt in einem Bereich, der in *V. amurensis* durch QTL-Analysen mit Resistenz gegen Mauke assoziiert werden konnte (Kuczmog & Horva, 2012). Der Fund eines TIR-NBS-LRR Gens in diesem Bereich in 'Regent' könnte darauf hindeuten, dass in *V. amurensis* die Resistenz gegen *A. tumefaciens* möglicherweise durch ein TIR-NBS-LRR Gen vermittelt wird. Dies ist jedoch nur eine vage Vermutung, da *V. amurensis* aus dem asiatischen Raum stammt und man davon ausgeht, dass die resistente Haplophase von 'Regent' von einer Introgression einer nordamerikanischen Wildrebe stammt.

Um einen Eindruck zu bekommen, welche der identifizierten Gene auf den sequenzierten BAC-Klonen transkribiert werden, wurden die RNAseq Daten der T<sub>0</sub> Proben (vor Inokulation mit *P. viticola*) aus Arbeiten zum Resistenzlokus *Rpv10*, welcher Resistenz gegen den Falschen Mehltau vermittelt, auf H25C10 und B18K14 als Referenz projiziert. Dies war möglich, da die für die RNAseq verwendeten Individuen 2008-059-121 und 2008-059-020 in einer Markeranalyse zeigten, dass sie den Resistenzlokus *Ren3* besitzen (Abbildung 25). Durch ein Large Gap Read Mapping mit angeschlossener Transcript Discovery (LGRM+TD, CLC Genomics Workbench) konnte hierbei die Transkription der vorhergesagten Gene FGENESH-2HC und *Ren3-1* nachgewiesen werden. Bei FGENESH-2HC handelt es sich laut blast-x Analyse möglicherweise um das *Dcc1* Orthog aus *Saccharomyces cerevisiae*, welches in der S-Phase der Zellteilung in einem Proteinkomplex dafür verantwortlich ist, die beiden Schwesterchromatiden zusammenzuhalten (Tabelle 21) (Mayer *et al.*, 2001). Für *Ren3-1* konnte durch das LGRM+TD eine andere mRNA Struktur vorhergesagt werden, als die der *in silico* Vorhersage von FGENESH. Die vorhergesagte mRNA überspannte dabei mit einer Länge von 2641 nt den Bereich von FGENESH-*Ren3-1* und *-Ren3-2* und es wurden insgesamt vier Introns vorhergesagt (Abbildung 26, Abbildung 61, Tabelle 23, Tabelle 27). Für die möglichen R-Gene *Ren3-3* und *Ren3-4* konnten hierbei keine Transkripte vorhergesagt werden. Für das Gen *Ren3-5* vom Typ TIR-NBS-LRR auf dem BAC-Klon B18K14 konnte ebenfalls Transkription festgestellt werden. Insgesamt konnten fünf Introns vorhergesagt werden wobei vier davon mit der FGENESH Vorhersage übereinstimmten (Abbildung 27).

Durch diese Analyse konnte gezeigt werden, dass die beiden Gene *Ren3-1* und *Ren3-5* im nicht inokulierten Zustand bei Genotypen mit dem Resistenzlokus *Ren3* transkribiert werden. Da *Ren3-5* jedoch außerhalb des identifizierten QTLs lag, wurde dieses Gen nicht näher untersucht.

#### IV.2.1 Transkript Analyse von R-Genen aus *Ren3*

Für die *in silico* vorhergesagten R-Gene in *Ren3* wurden 5', 3'RACE, RT-PCR und CR-RT-PCR-Analysen durchgeführt, um die vorhergesagten Transkripte zu validieren. Für die durchgeführten 5'-, 3'RACE und RT-PCRs Analysen wurde cDNA von zwei für den Resistenzlokus *Ren3* homozygoten F1-Individuen der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Lemberger' verwendet. Für CR-RT-PCR Analysen wurde cDNA von 'Regent' verwendet. Bei den Analysen der Transkripte von *Ren3-2*, *Ren3-3* und *Ren3-4* konnten jedoch keine positiven Klone nach Klonierung der jeweiligen Amplifikate identifiziert werden, was in Übereinstimmung mit LGRM+TD war. Für *Ren3-1* konnten in allen durchgeführten Analysen

positive Klone sequenziert werden. Daraus ergaben sich zwei unterschiedliche cDNAs (Abbildung 35, Abbildung 61, Tabelle 27).

**Tabelle 27:** Übersicht über die *in silico* vorhergesagten und experimentell detektierten Transkripte für *Ren3-1*.

	RNA Länge [bp]	CDS Länge [bp]	Funk. Domänen in CDS	Anzahl Intron	Intron I [bp]	Intron II [bp]	Intron III [bp]	Intron IV [bp]
<b>FGENESH</b>	3584	2158	CC,NB-ARC, LRR	2	57	141		
<b>LGRM+TD</b>	5939	1314	NB-ARC	4	561	1997	583	157
<b>5'/3'RACE</b>	3584	1326	NB-ARC	1		1997		
<b>CR-RT-PCR</b>	2392	1284	NB-ARC	1	561			

Mithilfe der 5'-, 3'RACE und RT-PCR konnte eine cDNA amplifiziert und sequenziert werden, welche wie die Vorhersage durch das LGRM+TD das 1997 bp große Intron II aufwies, jedoch unterschied sich das 5'-Ende dieser cDNA von der des LGRM+TD (Abbildung 35, Tabelle 27). Mit der CR-RT-PCR-Analyse konnte eine weitere cDNA amplifiziert werden, welche im Gegensatz dazu das 561 bp große Intron I des LGRM+TD aufwies, aber wiederum ein verkürztes 3'-Ende ohne das Intron II besaß (Abbildung 35, Tabelle 27). Eine Exon/Intron Struktur, wie sie durch FGENESH vorhergesagt war, konnte jedoch durch keine der durchgeführten Analysen detektiert werden. Die identifizierten cDNAs wiesen alle eine ähnlich lange kodierende Sequenz auf, welche in allen drei Fällen nur die vorhergesagte NB-ARC Domäne kodierte (Tabelle 27). Durch Splice-Ereignisse oder verkürzte Transkripte wurde die LRR Domäne in allen Fällen deletiert. Durch das vorhergesagte Intron I von FGENESH hätte sich das Leseraster der kodierenden Sequenz verändert, was dazu geführt hätte, dass die CC-Domäne in der CDS vorhanden gewesen wäre (Tabelle 27). Jedoch konnte dieses Splice-Ereignis in keiner der drei cDNAs festgestellt werden, was zum Ausschluss der CC-Domäne aus der kodierenden Sequenz bei diesen führte. Durch die Analysen konnten alternative Splice-Varianten von *Ren3-1* detektiert werden, wie sie bereits für andere R-Gene beschrieben wurden (Feechan *et al.*, 2013; Ferrier Cana *et al.*, 2005; Gassmann, 2008; Yu *et al.*, 2017). Beispielsweise konnte für das TIR-NBS-LRR R-Gen *N* aus *Nicotiana tabacum*, welches Resistenz gegen TMV vermittelt, zwei Splice-Varianten gefunden werden, bei der eine Variante nur die TIR- und NB-ARC-Domäne kodierte. Jedoch konnte in diesem Fall gezeigt werden, dass beide Varianten für eine komplette Resistenz gegen das Virus nötig waren (Yu *et al.*, 2017). Bei der Analyse der R-Gene des Resistenzlokus *Run1/Rpv1* konnten vier unterschiedliche Splice-Varianten der Resistenz-vermittelnden Gene detektiert werden, bei denen die Transkripte verkürzt waren. Dies führte zum Verlust der LRR- und teilweise zum partiellen Verlust der NB-ARC-Domäne (Feechan *et al.*, 2013).



Von einem, wie hier beschriebenen, Verlust der N- und C-terminalen funktionellen Domänen, wurde jedoch noch nie berichtet. Da durch die LRR-Domäne bekanntermaßen entweder Effektoren von Pathogenen erkannt oder die Veränderung von „Guard“-Proteinen detektiert werden und durch die CC-Domäne eine spezifische Protein-Protein Interaktion ermöglicht wird um z.B. Signalkaskaden zu aktivieren, ist es somit fraglich, ob aus den hier beschriebenen cDNAs funktionelle R-Proteine translatiert werden (Deslandes & Rivas, 2011; Spoel & Dong, 2012). Jedoch ist zu bedenken, dass die gesamten hier diskutierten Analysen mit cDNAs von nicht inokulierten Proben durchgeführt wurden. Es könnte somit die Möglichkeit bestehen, dass erst nach Inokulation mit dem Echten Mehltau ein alternatives Splice-Ereignis eintritt, bei dem die vorhergesagten funktionellen Domänen durch andersartige Transkription und/oder differentielles Splicing in der CDS vorhanden sind. Hierfür müssen die Analysen ebenfalls mit cDNAs von inokulierten Proben durchgeführt werden.

#### **IV.2.2 Funktionelle Analyse von *Ren3-1* aus *Ren3***

Für die funktionelle Analyse von *Ren3-1* wurden zum einen amiRNAs für einen Knock-down in 'Regent' als *Ren3/Ren9*-Träger generiert. Zum anderen wurde das Gen mit flankierenden genomischen Bereichen amplifiziert, in einen Pflanzentransformationsvektor kloniert und in die Rebsorten 'Riesling' und 'Chardonnay' transformiert. Die beiden Rebsorten besitzen einen genetischen *V. vinifera* Hintergrund und sind somit anfällig für den Echten Mehltau. Für die Selektion von regenerierten, transgenen *in vitro* Pflanzen wurde Phosphinothricin als neuer Selektionsmarker etabliert. Eine Kontrolle auf erfolgreiche Transformation der so selektierten Pflanzen war jedoch aus zeitlichen Gründen noch nicht möglich.

##### **IV.2.2.1 Knock-down von *Ren3-1* durch amiRNAs**

Bei der Regeneration der mit den amiRNAs transformierten Pflanzen konnte ein Trend beobachtet werden, welcher sich auf regenerierte Pflanzen bezog, welche mit dem amiRNA Konstrukt *amiR-Ren3-1\_2* transformiert worden waren. Diese Pflanzen wiesen ein vermindertes Wachstum verglichen zu den regenerierten Pflanzen mit dem *amiR-Ren3-1\_1* Konstrukt auf (Abbildung 42). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte eine geringe Spezifität der generierten amiRNA *amiR-Ren3-1\_2* sein, wodurch nicht nur das Transkript von *Ren3-1*, sondern weitere NBS-LRR Gene herunter-reguliert werden. Eine falsche Regulation von NBS-LRR Genen wurde in einigen Fällen bereits mit morphologischen Phänotypen assoziiert (Lee & Yeom, 2015). Die Hypothesen der „Off-Targets“ wird durch fünf weitere Treffer, auf Chromosom 15, bei einer blast-Analyse dieser

amiRNA gegen das Referenzgenom PN40024 12Xv0 untermauert. Dies liegt an der Bindestelle der generierten amiRNA, welche sich in der P-Loop der NB-ARC-Domäne befindet. Die P-Loop stellt einen hochkonservierten Bereich dieser Domäne dar (Abbildung 37). In diesem befindet sich die Nukleotid-Bindestelle für ADP und ATP wodurch eine Konformationsänderung des Proteins nach Erkennung eines Pathogen-Effektors oder einer Veränderung des überwachten Proteins („Guardee“) ermöglicht wird. Durch diese Konformationsänderung wird die Eigeninhibierung der N- und oder der C-terminalen Domänen aufgehoben, wodurch das NBS-LRR-Protein aktiv ist (Sekhwal *et al.*, 2015). Dieser Bereich kodiert somit eine essenzielle Funktion des translatierten Proteins weshalb die amiR-*Ren3-1\_2* ausgewählt wurde. Dies sollte dazu führen, dass nach einem gezielten Schnitt der *Ren3-1* mRNA durch den RISC-Komplex mit dieser amiRNA als „Guide“ in jedem Fall kein teilfunktionelles NBS-LRR-Protein aus der übriggeblieben mRNA translatiert werden kann. Eine genaue Aussage, ob durch dieses Konstrukt mehrere Gene herunter-reguliert werden, muss jedoch erst durch RT-qPCR Analysen getestet werden, nachdem die regenerierten Pflanzen durch eine PCR Analyse eindeutig als transgen identifiziert wurden.

### IV.3 Differentielle Genregulation nach Inokulation mit *E. necator*

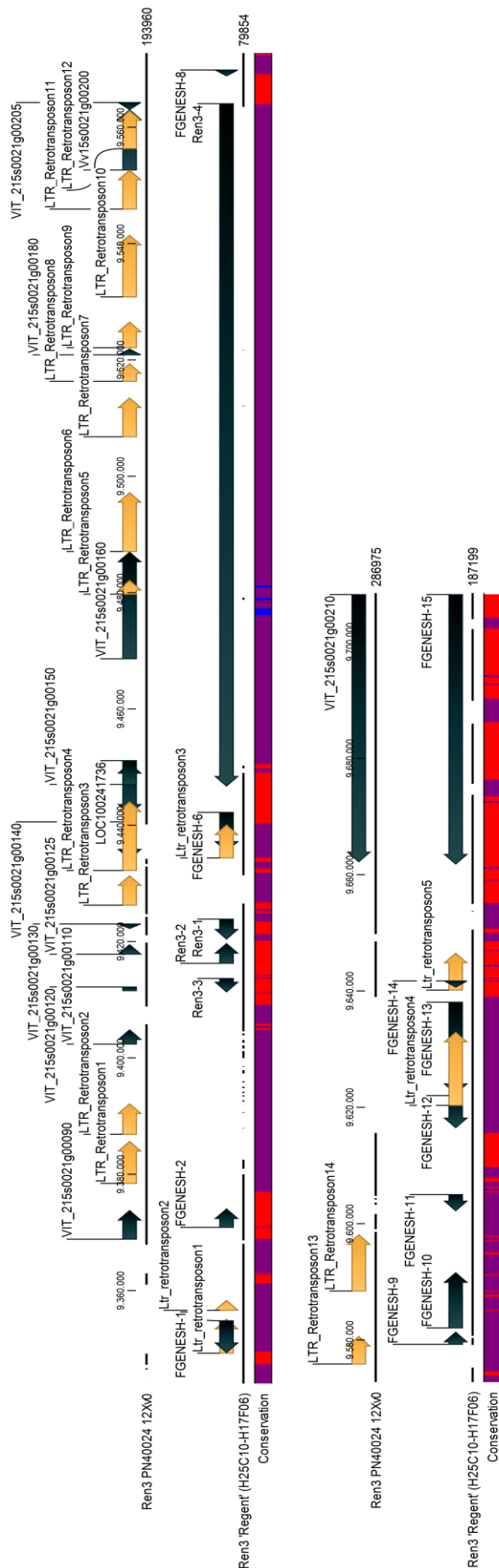
Bereits in Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass 'Regent' als *Ren3/Ren9*-Träger eine differentielle Regulation von Resistenz-assoziierten Genen aufweist (Welter *et al.*, 2017). Hierbei wurde aber nur die Regulation 10 Stunden nach Inokulation mit *E. necator* betrachtet. Um einen besseren Einblick in die differentielle Regulation von Resistenz-assoziierten Genen zu erhalten, wurde in dieser Arbeiten neben den 10 Stunden noch die Zeitpunkte 24 und 48 Stunden nach Inokulation untersucht. Es wurden wie in den Vorarbeiten 'Regent' als resistenter Genotyp und zum Vergleich 'Chardonnay' als anfälliger Genotyp verwendet. Als Pflanzenmaterial wurden *in vitro* propagierte Pflanzen der beiden Genotypen verwendet, um einen Umwelteinfluss und eine mögliche Vorinfektion mit anderen Pathogenen auszuschließen. Bei der Inokulation wurden die obersten drei Blätter der Pflanze mit *E. necator* Sporen inokuliert. Für jeden Zeitpunkt wurden jeweils drei biologische Wiederholungen untersucht, bei denen die drei inokulierten Blätter in der RNA Extraktion zusammengeführt wurden. Um eine erfolgreiche Inokulation nachzuweisen, wurden zusätzlich Blätter fünf Tage nach Inokulation abgenommen mit Trypanblau-gefärbt und mikroskopiert. Auf den inokulierten Blättern war ein deutliches Wachstum von *E. necator* bei beiden Genotypen zu erkennen. Bei 'Regent' konnte, wie schon zuvor beschrieben HR

assoziiert mit den Appressorien des Pilzes detektiert werden (Abbildung 46) (Zendler *et al.*, 2017).

### IV.3.1 R-Gene des Resistenzlokus *Ren3*

Als erstes wurden die R-Gene des Resistenzlokus *Ren3* untersucht, um die Ergebnisse des LGRM+TD und der Transkriptanalyse zu validieren. Für die identifizierten Gene *Ren3-2* und *Ren3-3* konnte in der Tat keine Transkription festgestellt werden, was den Erwartungen durch des LGRM+TD und der Transkriptanalyse entsprach (Daten nicht gezeigt). Für die Gene *Ren3-1*, *Ren3-4* und *Ren3-5* wurde jeweils nur in 'Regent' ein Amplifikat erhalten. Das Gen *Ren3-5*, welches außerhalb des identifizierten QTLs für *Ren3* liegt, zeigte nach Inokulation keine Induktion, sondern wurde ebenfalls wie *Ren3-1* reprimiert.

*Ren3-4*, für welches weder im LGRM+TD noch in der Transkriptanalyse eine Transkription festgestellt wurde, zeigte eine leichte Induktion 10 und 24 Stunden nach Inokulation und wurde nach 48 Stunden reprimiert (Abbildung 47). Eine erste Vermutung war, dass es sich hierbei um eine falsch positive Amplifikation handelt, da auf Chromosom 15 im Referenzgenom PN40024 12Xv0 zwei weitere homologe Gene mit hoher Sequenzähnlichkeit gefunden wurden. Daher wurde das RT-qPCR Amplicon im Anschluss sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten, dass es sich beim dem Amplicon sehr wohl um *Ren3-4* aus 'Regent' handelt (Abbildung 63). Die erhaltenen Ergebnisse für die Expression von *Ren3-1* könnten die Ergebnisse der Transkriptanalyse unterstützen, dass es sich hierbei möglicherweise nicht um das gesuchte Resistenz-vermittelnde R-Gen handelt. Ein Vergleich des sequenzierten Resistenzlokus *Ren3* mit dem homologen Bereich aus dem Referenzgenom PN40024 12Xv0, welches aus einer weitgehend homozygoten Selbstung des *E. necator* anfälligen 'Pinot Noir' erstellt wurde, zeigte sehr große Sequenzunterschiede zwischen den beiden Genotypen. Das Sequenzalignment zeigte im kodierenden Bereich von *Ren3-4* eine ca. 114 kb große Insertion (Abbildung 58). In dieser Insertion in PN40024 12Xv0 konnten acht LTR-Retroelemente vorhergesagt werden. Flankierend zu diesem Bereich wurden im Referenzgenom zwei NBS-LRR-Gene annotiert (LOC100241736, VIT\_215s0021g00205, Abbildung 58). Im Promotorbereich von *Ren3-1* konnte ebenfalls in PN40024 12Xv0 ein zusätzliches Retrotransposon vorhergesagt werden welches in 'Regent' nicht vorhanden ist, was erklären könnte, warum *Ren3-1* nur in 'Regent' transkribiert wird (Abbildung 58, LTR-Retrotransposon-3 PN). Ein Alignment der flankierenden Gene der 114 kb Insertion aus dem anfälligen 'Pinot Noir' mit *Ren3-4* aus Regent zeigte, dass sich dieses Gen aus den beiden NBS-LRR Genen zusammensetzt,



**Abbildung 59:** Alignment des sequenzierten Resistenzlokus *Ren3* aus 'Regent' mit dem identifizierten homologen Bereich aus dem Referenzgenom PN40024 12Xv0. Die Positionsangaben über dem Alignment sind relativ zu der Position im Referenzgenom. Für das Alignment wurde das Online Tool webPRANK mit den Standardeinstellungen verwendet (Löytynoja & Goldman, 2010). Es wurden vorhergesagte Gene (schwarz; FGENSESH, VIT Annotation) und durch LTR Harvest vorhergesagte (Standardeinstellungen) LTR Retrotransposons (orange) eingezeichnet (Ellinghaus *et al.*, 2008). Zusätzlich wurde die prozentuale Übereinstimmung farbkodiert eingezeichnet: Rot = 100 %, lila = 50 % (SNP, Deletion, Insertion), blau = 0 % (keine Sequenzinformation).

wodurch die Duplikation der NB-ARC-Domäne in *Ren3-4* aus 'Regent' erklärt werden könnte (Tabelle 21, ,Abbildung 64). In der Insertion in PN40024 12Xv0 sind weitere NBS-LRR-Gene (*VIT\_215g0021g00180*, *Vv15s0021g00200*) und Bruchstücke (NB-ARC-Domäne zwischen LTR-Retrotransposon-10 und -11) von solchen vorhanden. Durch diese Umstände könnte man vermuten, dass dieser Bereich ursprünglich anders aussah. Subtrahiert man die gefundenen Retroelemente von diesem Bereich und ergänzt die gefundenen Bruchstücke von NBS-LRR Genen zu funktionellen Formen so erhält man ein NBS-LRR Cluster mit sieben Homologen (Abbildung 65). Solche NBS-LRR Cluster sind keine Seltenheit. Beste Beispiele hierfür sind der Resistenzlokus *Run1/Rpv1* mit sieben TIR-NBS-LRR Genen und der Resistenzlokus *Ren1* mit neun CC-NBS-LRR Genen

(Abbildung 24). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass in anderen Pflanzenarten bis zu 80 % der CC-NBS-LRR Gene in Clustern von drei und mehr vorkommen (Andersen *et al.*, 2017). Als es dann zur Trennung der ursprünglichen Population von *Vitis* in Nord-Amerika und Eurasien kam, könnte sich dieser Bereich unterschiedlich entwickelt haben. Durch eine zufällige Genkonversion der beiden flankierenden Gene zu *Ren3-4*, möglicherweise durch homologe Rekombination, entstand ein NBS-LRR Gen, welches durch seine Resistenzvermittlung gegen den Echten Mehltau einem positiven Selektionsdruck unterlag (Nishimura & Dangl, 2010). Derselbe Locus unterlag in Europa einem negativen bzw. fehlenden Selektionsdruck durch die Abwesenheit von Pathogenen, wodurch dieser Bereich durch die Akkumulation von Retroelementen still gelegt wurde (Abbildung 65). Man geht davon aus, dass ein Verlust von nicht benötigten R-Genen ein Vorteil für die Pflanze bietet, da hierdurch die Möglichkeit einer unabsichtlichen Autoimmunität vermindert werden kann (Spoel & Dong, 2012). Dieses Szenario scheint plausibel, da davon ausgegangen wird, dass es sich bei *Ren3* um eine genomische Introgression einer unbekanntes nordamerikanischen Wildrebenart handelt.

Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass RNAseq Daten in jedem Fall eine Validierung durch eine alternative Methode benötigen und dass das R-Gen *Ren3-4* in zukünftigen Arbeiten näher untersucht werden muss, um eindeutig klären zu können, welches der beiden transkribierten Gene letztendlich das Resistenz-vermittelnde ist.

#### IV.3.2 Signaltransduktion nach Pathogen Rezeption durch R-Gene

Als bekannte Signaltransduktoren nach der Pathogenerkennung durch R-Gene sind die Gene *NDR1* und *EDS1* sehr gut beschrieben. Wie bereits beschrieben, wurde das Gen *NDR1* mit der Signalweiterleitung von CC-NBS-LRR Genen nach direkter (Effektor) oder indirekter („Guardee“) Erkennung in Verbindung gebracht (Lee & Yeom, 2015). Bei *NDR1* handelt es sich um ein Plasmamembran-gebundenes Protein mit unbekannter Funktion, welches für die Resistenzvermittlung gegen virulente Bakterien und Oomyceten benötigt wird (Century *et al.*, 1995; Coppinger *et al.*, 2004). Da es sich bei den im *Ren3* Locus identifizierten vier R-Genen um CC-NBS-LRR Gene handelt, wurde dieses Gen auf eine differentielle Regulation nach Inokulation mit *E. necator* überprüft. Es konnte jedoch keine eindeutige Induktion dieses Gens nach Inokulation bei den beiden untersuchten Genotypen 'Regent' und 'Chardonnay' festgestellt werden. Da für dieses Gen durch eine Überexpression eine erhöhte Resistenz gegen das Pathogen *P. syringae* Stamm DC3000 vermittelt wird, würde man vermuten, dass bei einer Beteiligung dieses Gens an der Resistenz gegen den Echten Mehltau ebenfalls eine Steigerung der Expression feststellbar ist (Coppinger *et al.*, 2004). Eine mögliche Erklärung für die nicht vorhandene differentielle Regulierung von *VvNDR1* (VIT\_219s0014g05430)

könnte sein, dass es sich hierbei nicht um das funktionelle Ortholog aus *A. thaliana* handelt. Eine weitere Erklärung könnte aber auch die Möglichkeit sein, dass es für die Signalweiterleitung nach Pathogen-Perzeption durch CC-NBS-LRR Gene neben dem beschriebenen *NDR1* und *EDS1* Weg noch einen weiteren Weg der Weiterleitung gibt. Beispielsweise wurde für die Resistenzweiterleitung der Gene *RPP7* und *RPP8* gezeigt, dass sie weder von *EDS1* noch von *NDR1* abhängig sind (Glazebrook, 2005). Der Vollständigkeit halber wurden im Anschluss noch das *EDS1* Ortholog der Weinrebe, *VvEDS1*, und die drei beschriebenen *VvEDS1-like* (*VvEDL1*, *VvEDL2* und *VvEDL5*) homologen Gene auf eine differentielle Genregulation hin untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die vier Gene nach Inokulation mit *E. necator* einer differentiellen Regulation unterliegen. Die Gene *VvEDS1*, *VvEDL2* und *VvEDL5* waren bei 'Chardonnay' 10 Stunden nach Inokulation stark induziert. Eine Induktion der Transkription von *VvEDS1* 24 Stunden nach Inokulation mit *E. necator* konnte auch in 'Cabernet Sauvignon' nachgewiesen werden (Gao *et al.*, 2010). In 'Chardonnay' kehrte die Transkription der Gene *VvEDS1* und *VvEDL5* nach 24 Stunden, im Gegensatz zu 'Regent', wieder auf ihren basalen Wert zurück. Für *VvEDL1* konnte in 'Chardonnay' keine differentielle Regulation festgestellt werden und *VvEDL2* blieb bis 48 Stunden nach Inokulation schwach induziert. Alles in allem entspricht das Transkriptionsmuster der vier Gene in 'Chardonnay' dem von 'Cabernet Sauvignon' 24 Stunden nach Behandlung mit Salizylsäure (SA). Hierbei wurden ebenfalls die Gene *VvEDS1*, *VvEDL2* und *VvEDL5* induziert (Gao *et al.*, 2010). Man kann somit vermuten, dass bei der Interaktion von 'Chardonnay' mit dem Echten Mehltau SA, welche wichtig ist, für die Immunantwort der Pflanze bei biotrophen Pathogenen ist, eine Rolle spielt (Glazebrook, 2005). 'Regent' zeigt hier ein komplett anderes Muster der differentiellen Regulation von *VvEDS1* und seinen drei homologen. Den deutlichsten Unterschied bei 'Regent' stellt die Expression des Gens *VvEDL1* dar. Dieses Gen war nach Inokulation mit *E. necator* über die untersuchten 48 Stunden konstant induziert im Gegensatz zu 'Chardonnay', 'Cabernet Sauvignon' und die Echten Mehltau resistenten Rebsorte 'Norton'. Die Resistenz von 'Norton' gegenüber dem Echten Mehltau kann höchst wahrscheinlich durch eine konstitutive starke Expression von *VaEDS1*, bedingt durch Unterschiede im Promotorbereich dieses Gens, zurückgeführt werden (Gao *et al.*, 2010, 2014). *VvEDS1* war in 'Regent', verglichen mit 'Chardonnay', nur gering induziert. *VvEDL2* und *VvEDL5* dagegen zeigten wie in 'Chardonnay' eine starke differentielle Regulation, wobei die Transkriptlevel in 'Regent' zu allen untersuchten Zeitpunkten konstant hoch blieben (Abbildung 49). Dieser Umstand könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei 'Regent' ein anderer Weg der Resistenzvermittlung

verfolgt wird oder *VvEDLI* in 'Regent' die Rolle von *VvEDS1* übernimmt. Außerdem ist zu bedenken, dass 'Regent' neben *Ren3* noch über den Resistenzlokus *Ren9* verfügt, für welchen noch keine Sequenzinformationen vorhanden sind und somit noch keine Aussage über die dort kodierten R-Gene gemacht werden kann.

Für *EDS1* wurde gezeigt, dass es in den Signaltransduktionsweg von TIR-NBS-LRR Genen wie zum Beispiel bei der Resistenzvermittlung durch z.B. *RPS4* eine essenzielle Rolle spielt. Bei der Resistenzvermittlung von *RPS4* nach Infektion mit dem avirulenten Stamm DC3000 *AvRps4* von *P. syringae* wurde gezeigt, dass durch den Effektor *AvRps4* die Interaktion von *EDS1* *RPS4* gelöst wird, wodurch beide Proteine in den Nukleus transloziert werden können. Im Zellkern geht *RPS4* eine Interaktion mit dem TIR-NBS-LRR WRKY Protein *RRS1* ein, wodurch es zu einer HR kommt. Ein Vorhandensein von *EDS1* im Zellkern ist für die transkriptionelle Umprogrammierung ebenfalls notwendig. In diesem Beispiel wurde somit deutlich, dass *EDS1* sowohl für die Resistenzantwort wichtig ist als auch das überwachte „Guardee“ von *RPS4* darstellt (Bhattacharjee *et al.*, 2011; Heidrich *et al.*, 2011). Man geht davon aus, dass diese strikte Trennung von *EDS1* (TIR-NBS-LRR) und *NDRI* (CC-NBS-LRR) nicht wirklich existiert, da mittlerweile auch CC-NBS-LRR Gene beschrieben wurden, die *EDS1*-abhängig sind. Eines dieser Proteine ist *HRT* (HR to Turnip Crinckle Virus), welches Resistenz gegen den Turnip Crinckle Virus vermittelt. Für dieses Protein, wurde wie auch schon für *RPS4*, eine direkte Interaktion mit *EDS1* nachgewiesen die, jedoch nicht wie bei *RPS4* durch die Anwesenheit eines Effektors aufgelöst wird (Zhu *et al.*, 2011).

#### IV.3.3 Differentielle Regulierung von bekannten *PR*-Genen der Weinrebe

Die „Pathogenesis Related“ (*PR*) Gene sind die wohl bekanntesten, durch Pathogene induzierten Gene. Sie wurden als erste Gene durch ihre starke differentielle Regulation nach Infektion mit Pathogenen beschrieben und es konnte gezeigt werden, dass einige von ihnen auch durch SA induziert werden können (van Loon & van Strien, 1999; Sekhwal *et al.*, 2015). Es konnte weiter gezeigt werden, dass das Gen *NPR1* (*NON EXPRESSOR OF PR GENES 1*) maßgeblich an der transkriptionellen Regulation dieser Gene beteiligt ist (Dong, 1998; Glazebrook, 2001; Thomma *et al.*, 2001; Pieterse *et al.*, 2012; Sekhwal *et al.*, 2015). Bei den hier untersuchten Genen handelt es sich um die *V. vinifera* Orthologen von *NPR1*, *PR1*, *PR5* und *PR10*. Die Transkription von *VvNPR1* war in 'Chardonnay' und 'Regent' 10 Stunden nach Inokulation mit *E. necator* induziert. Im resistenten Genotyp 'Regent', war die Expression jedoch fast doppelt so hoch wie im anfälligen Genotyp 'Chardonnay'. Die Expression kehrte jedoch bei beiden Genotypen nach 24 Stunden wieder auf ihren basalen Wert zurück. Eine Induktion dieses Gens in beiden Genotypen war zu erwarten, da es sich bei

der Regulation der *PR*-Gene durch *NPRI* um einen generellen Resistenzmechanismus handelt. Die doppelt so hohe Expression von *VvNPRI* in 'Regent' korreliert mit der um einiges höheren Expression von *VvPRI* 10 Stunden nach Inokulation mit dem Echten Mehltau (Abbildung 51). Für *NPRI*, welches im nicht inokulierten Zustand im Zytoplasma in einem Verbund aus mehreren *NPRI* Proteinen vorliegt, wurde gezeigt, dass nach Anstieg des SA Levels in der Zelle Monomere von *NPRI* in den Nukleus transloziert werden. Dort interagiert es mit Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription von *PRI* aktivieren (Pieterse *et al.*, 2012). Bei 'Chardonnay' ist zu diesem Zeitpunkt nur eine geringe Expressionssteigerung von *VvPRI* zu erkennen, die 24 Stunden nach Inokulation weiter ansteigt und 48 Stunden später konstant auf diesem Niveau bleibt. Für 'Regent' steigt die Expression von *VvPRI* ebenfalls 24 Stunden nach Inokulation, fällt jedoch nach 48 Stunden auf dasselbe Niveau wie bei 'Chardonnay'. Die Reaktion von 'Regent' ist somit schneller und stärker verglichen mit dem anfälligen Genotyp, wodurch eine höhere Resistenz durch die antifugale Wirkung von *VvPRI* erzielt wird (Niderman *et al.*, 1995). Beide Gene, *VvPR5* und *VvPRI0*, wurden bereits in Vorarbeiten auf ihre differentielle Expression nach Inokulation mit dem Echten Mehltau in 'Regent' und 'Chardonnay' untersucht. Sie zeigten dabei 10 Stunden nach Inokulation mit dem Echten Mehltau eine starke Induktion, die auf 'Regent' beschränkt war (Welter *et al.*, 2017). In den hier gezeigten Versuchen konnte die exklusive Induktion in 'Regent' jedoch nicht bestätigt werden. Beide Gene zeigten auch in 'Chardonnay' eine starke Induktion 10 Stunden nach Inokulation, welche höher war als bei 'Regent'. *VvPRI0* zeigte 24 Stunden nach Inokulation mit der Probe von 'Chardonnay' einen etwa dreimal so hohen „Fold change“ wie der berechnete von 'Regent'. Beide Gene waren jedoch 48 Stunden nach Inokulation in 'Regent' stärker transkribiert als in 'Chardonnay', in welchem diese Gene stark reprimiert wurden (Abbildung 52, Abbildung 53). Diese längere Expression der beiden *PR* Genprodukte in 'Regent' deutet auf eine länger anhaltende Resistenzantwort hin. Durch die antifugale Wirkung der beiden Gene könnte somit das Wachstum des Pilzes stärker eingeschränkt werden, was mit mikroskopischen Untersuchungen, bei denen ein vermindertes Wachstum von *E. necator* auf 'Regent' und 'Chambourcin' (Vater und Resistenzdonor von 'Regent') festgestellt wurde, korreliert (Cheong *et al.*, 1997; Lebel *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014b; Zendler *et al.*, 2017).

#### **IV.3.4 Differentielle Regulation von bekannten Regulatoren der „Hypersensitiven Reaktion“**

Wie durch vorangegangene Studien und durch Versuche in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, reagiert 'Regent' als *Ren3/Ren9*-Träger mit einer HR auf eine Infektion mit dem



Echten Mehltau. Diese HR ist limitiert auf den Bereich um die gebildeten Appressorien des Pilzes (Abbildung 20, Abbildung 46) (Zendler *et al.*, 2017). Diese Tatsache korrelierte mit dem Vorhandensein von vier CC-NBS-LRR Genen im Intervall von *Ren3* (Abbildung 22). Für diese Art von RGAs wurde bereits in anderen Studien gezeigt, dass sie Vermittler für eine HR nach Infektion mit einem avirulenten Pathogen sind (Nishimura & Dangl, 2010; Coll *et al.*, 2011; Spoel & Dong, 2012; Lee & Yeom, 2015; Sekhwal *et al.*, 2015; Baggs *et al.*, 2017). Daher sollten in der hier vorgestellten Arbeit orthologe Gene des „Deathsomes“, wie es in Coll *et al.*, 2011 beschrieben wurde, in *V. vinifera* näher untersucht werden (Abbildung 54). Hierfür wurde in der Literatur nach bereits beschriebenen orthologen Genen in *V. vinifera* gesucht. Bei *AtMCI* handelt es sich um eine Typ I Metacaspase, für welche gezeigt wurde, dass sie ein Positivregulator des programmierten Zelltods in *A. thaliana* ist (Coll *et al.*, 2010, 2011). Die orthologen Gene in tierischen Zellen sind die Caspasen, die eine wesentliche Rolle bei der Induktion des Zelltods spielen (Coll *et al.*, 2011). In *V. vinifera* wurden insgesamt vier Typ I (*VvMCI*, *VvMC2*, *VvMC3* und *VvMC4*) und zwei Typ II (*VvMC5*, *VvMC6*) Metacaspasen identifiziert (Zhang *et al.*, 2013). Eine funktionelle Analyse dieser Gene, durch Komplementationsstudien in der Knockout Mutante *A. thaliana atmcl*, wurde jedoch noch nicht durchgeführt. Es war somit nicht bekannt, welche der vier Typ I Metacaspasen das funktionelle Ortholog der Weinrebe darstellt. Daher, wurden alle beschriebenen *V. vinifera* Metacaspasen mittels RT-qPCR nach Inokulation mit *E. necator* untersucht. Eine generelle Beobachtung bei der Analyse der sechs Metacaspasen der Weinrebe war, dass ihre basale Expression im resistenten Genotyp 'Regent' relativ zu 'Chardonnay' um einiges geringer war. Für *VvMC3* war zum Zeitpunkt vor der Inokulation eine etwa 0,1-fache Expression in 'Regent', verglichen mit 'Chardonnay', feststellbar. Für *VvMC4* und *VvMC5* lag die relative Expression bei etwa 0,4 – 0,5 verglichen mit 'Chardonnay' (Abbildung 67). Der Expressionsverlauf unterschied sich zwischen 'Regent' und 'Chardonnay' bei *VvMCI*, *VvMC2*, *VvMC4* und *VvMC5*. Dabei war *VvMCI* 10 Stunden nach Inokulation leicht induziert, *VvMC2* zeigte eine leichte aber konstante Induktion über alle untersuchten Zeitpunkte, *VvMC4* blieb basal transkribiert wohingegen sie in 'Chardonnay' reprimiert wurde und *VvMC5* wurde wie *VvMCI* 10 Stunden nach Inokulation stärker transkribiert als in 'Chardonnay'. Durch die noch ausstehenden Komplementationsstudien kann hier jedoch keine klare Aussage darüber getroffen werden, welche der drei differentiell regulierten Typ I Metacaspasen nun für eine HR Induktion verantwortlich ist.

Für die Gene *LSD1* und *LOL1* des „Deathsome“ Komplexes waren keine orthologen Gene in der Literatur für *V. vinifera* beschrieben. Eine Suche nach Orthologen anhand der *A. thaliana*

Sequenz in der Datenbank von Gramene ([www.gramene.org](http://www.gramene.org)) lieferte jeweils ein Gen in *V. vinifera* für *LSD1* und *LOL1*. Das Gen *LSD1* wurde durch Knockout Studien in *A. thaliana* charakterisiert. Dabei wurde gezeigt, dass *lsd1* Mutanten von *A. thaliana* dazu neigen, eine spontane HR auf Blättern zu bilden, die sich ungehindert ausbreiten kann (Coll *et al.*, 2011; Lorrain *et al.*, 2003). Es handelt sich bei dem Produkt von *LSD1*, somit um einen Negativregulator des programmierten Zelltods. Bei *LOL1* dagegen handelt es sich um einen Positivregulator, wie durch Doppel-knockout Mutanten von *A. thaliana* gezeigt werden konnte (Coll *et al.*, 2011; Epple *et al.*, 2003). Dabei wurde gefunden, dass bei einem Doppel-knockout von *lsd1* und *lol1* der HR Phänotyp von *lsd1* alleine nicht mehr vorhanden war. Somit kann geschlussfolgert werden, dass *LOL1* als Positivregulator fungiert (Epple *et al.*, 2003). Bei den RT-qPCR Analysen in dieser Arbeit zeigte sich, dass das mögliche *LSD1* Ortholog, *VvLSD1*, bei 'Chadronnay' nach 24 Stunden reprimiert wird und ansonsten eine basale Transkription stattfindet. Bei 'Regent' war dieses Gen, verglichen mit dem Zeitpunkt vor der Inokulation leicht induziert. *VvLOL1* zeigte 10 Stunden nach Inokulation eine Expressionsänderung die in 'Regent' doppelt so stark war als in 'Chadronnay'. Nach 24 Stunden erreichte dieses Gen jedoch in beiden Genotypen wieder seine basale Expression. Eine Überexpression von *LOL1* führte bei *A. thaliana* zu einer HR bei Abwesenheit von Pathogenen (Epple *et al.*, 2003). Das erhöhte Transkriptniveau 10 Stunden nach Inokulation und die weitere basale Transkription korreliert zeitlich jedoch nicht mit dem bei 'Regent' beobachteten Phänotyp. Bei 'Regent' war erst ungefähr fünf Tage nach Inokulation mit dem Echten Mehltau eine HR assoziiert um die Appressorien deutlich sichtbar (Zendler *et al.*, 2017). Auch für diese Gene ist zu bedenken, dass es sich bisher nur um *in silico* Vorhersagen handelt und Komplementationsstudien mit den jeweiligen knockout Mutanten von *A. thaliana* noch ausstehen.

Als letztes Gen des postulierten „Deathsome“ Komplexes wurde der Transkriptionsfaktor *bZIP10* untersucht. Durch Studien der *bZIP* Transkriptionsfaktor Familie in *V. vinifera* waren bereits 55 Homologe bekannt. Dabei wiesen die beiden Gene *VvbZIP9* und *VvbZIP21* die höchste Ähnlichkeit zu *AtbZIP10* auf (Liu *et al.*, 2014). Ihre Expression wurde ebenfalls durch RT-qPCRs analysiert. Für *AtbZIP10* wurde gezeigt, dass es sich ebenfalls um einen Positivregulator des programmierten Zelltods handelt. *AtbZIP10* interagiert im Zytoplasma mit *LSD1* wodurch verhindert wird, dass der Transkriptionsfaktor in den Nukleus importiert wird. Durch Überexpression von *AtbZIP10* in der knockout Mutante *lsd1* konnte gezeigt werden, dass durch die Abwesenheit von *LSD1* dieser Transkriptionsfaktor ausschließlich im Nukleus vorzufinden ist und der HR Phänotyp von *lsd1* noch verstärkt wurde. Eine

Überexpression in einem Wildtyp Hintergrund von *A. thaliana* mit funktionellem *LSD1* zeigte dagegen eine Verteilung des Transkriptionsfaktors in Zytoplasma und Nukleus (Kaminaka *et al.*, 2006). Für den *bZIP* Transkriptionsfaktor *VvbZIP9*, konnte ein kontinuierlicher Anstieg des Transkriptlevels über die drei untersuchten Zeitpunkte bei 'Regent' festgestellt werden. Bei 'Chardonnay' war dagegen eine Repression festzustellen. Bei *VvbZIP21* konnte ebenfalls eine Repression in 'Chardonnay' festgestellt werden. Das Transkriptlevel von 'Regent' schwankte hier um den basalen Wert. Wie bei den Metacaspasen schon festgestellt, weisen die beiden untersuchten *bZIP* Transkriptionsfaktoren in 'Regent' eine geringere basale Expression verglichen mit 'Chardonnay' auf (Daten nicht gezeigt). Der kontinuierliche Anstieg des Transkriptlevels von *VvbZIP9* könnte mit der bei 'Regent' festgestellten HR korrelieren. Eine Analyse von späteren Zeitpunkten sollte hier mehr Aufschluss gewähren.

Es konnte hier gezeigt werden, dass drei der Typ I Metacaspasen, *VvLOL1* und der Transkriptionsfaktor *VvbZIP9* in 'Regent' nach Inokulation mit dem Echten Mehltau differentiell reguliert werden. Alle drei stellen Positivregulatoren der HR dar und könnten somit zu der bei 'Regent' beobachteten HR beitragen.

Die hier gezeigten Ergebnisse stellen den ersten Versuch dar, auf transkriptioneller Ebene, die beobachtete HR bei dem Echten Mehltau-resistenten Genotyp 'Regent' nachzuweisen. Durch Literaturrecherche und bioinformatische Analysen konnten hier mögliche orthologe Gene, welche in *A. thaliana* in die Regulation der Hypersensitiven Reaktion nach Infektion mit Pathogenen involviert sind, identifiziert werden. Jedoch konnte für die meisten der untersuchten Gene keine extremen Expressionschwankungen bei den untersuchten Genotypen beobachtet werden, was entweder in der Natur der Gene liegt oder an der Tatsache, dass es sich bei manchen nicht um die gesuchten Orthologen handelt. Da für alle hier untersuchten Gene, noch keine Komplementationsstudien mit entsprechenden Knockout Mutanten von *A. thaliana* durchgeführt wurden, sind diese Ergebnisse lediglich als erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung dieser Gene in den Prozess des programmierten Zelltods zu verstehen. In zukünftigen Arbeiten diesbezüglich sollte ebenfalls eine ganzheitliche Analyse des Transkriptoms mittels RNAseq in Betracht gezogen werden, um einen genaueren Einblick in die Genregulation von 'Regent' nach Inokulation mit dem Echten Mehltau zu erhalten.

#### **IV.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, konnte ein großer Schritt bei der Charakterisierung der Echten Mehltau Resistenz von 'Regent' gemacht werden. Für die beiden Resistenzloci *Ren3* und *Ren9* konnte im Zuge dieses Projekt zum ersten Mal eine HR

assoziiert mit den Appressorien des Pilzes als Resistenzmechanismus nachgewiesen werden. Um diese näher untersuchen zu können, müssen in Zukunft weitere histochemische Färbemethoden zur genauen Charakterisierung der HR durchgeführt werden. Außerdem müssen die beiden Resistenzloci getrennt nach Inokulation mit *E. necator* untersucht werden um einen möglichen additiven Effekt feststellen zu können. Hierfür müssen künstliche Inokulationen mit den bekannten rekombinanten Genotypen mit entweder *Ren3*, *Ren9* oder einer Kombination der beiden durchgeführt werden.

Der Resistenzlokus *Ren9* konnte in den vorgestellten Analysen auf ein Intervall von rund 300 kb auf Chromosom 15 eingegrenzt werden. Durch dieses kleine Intervall sollte es in zukünftigen Arbeiten, mit einer gezielten BAC-Klon Suche möglich sein, diesen Bereich in 'Regent' zu sequenzieren. Dies ermöglicht im Anschluss eine Suche nach möglichen RGAs, wie es bereits für *Ren3* geschehen ist.

In *Ren3* konnte ein Cluster aus vier CC-NBS-LRR Genen identifiziert werden, von denen zwei (*Ren3-1* und *Ren3-4*) exklusiv in 'Regent' transkribiert werden. Für *Ren3-4* konnte ein leicht gesteigertes Transkriptlevel nach Inokulation mit dem Echten Mehltau festgestellt werden, was vermuten lässt, dass es sich hierbei möglicherweise um das Resistenzvermittelnde RGA handelt. Wie bereits für *Ren3-1*, muss nun auch für *Ren3-4* die Intron/Exon Struktur geklärt werden. Ebenfalls müssen in der Zukunft knock-down bzw. knock-out Mutanten für dieses Gen generiert werden. Eine Transformation von *E. necator*-anfälligen Reben mit diesem Gen, ist ein weiterer notwendiger Schritt für die funktionelle Analyse dieses Gens.

Durch die Analyse der differentiellen Genregulation von Resistenz-assoziierten Genen nach Inokulation mit dem Echten Mehltau, konnte ein erster Schritt bei der Charakterisierung der beobachteten HR auf molekularer Ebene gemacht werden. Um hier einen genaueren Einblick zu erhalten, muss der Effekt der beiden Resistenzloci auf die differentielle Regulation dieser Gene untersucht werden. Hierfür sollten RNAseq-Experimente mit inokulierten Genotypen, die entweder *Ren3* oder *Ren9* tragen, durchgeführt werden.



## Literatur

- Agurto, M., Schlechter, R. O., Armijo, G., Solano, E., Serrano, C., Contreras, R. A., Zúñiga, G. E. & Arce-Johnson, P. (2017).** *RUN1* and *REN1* Pyramiding in Grapevine (*Vitis vinifera* cv. Crimson Seedless) Displays an Improved Defense Response Leading to Enhanced Resistance to Powdery Mildew (*Erysiphe necator*). *Front Plant Sci* **8**, 1–15.
- 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.
- Alleweldt, G. & Possingham, J. V. (1988).** Progress in grapevine breeding. *Theor Appl Genet* **75**, 669–673.
- Andersen, E. J., Neupane, S. & Benson, B. V. (2017).** Comparative Genomics of Non-TNL Disease Resistance Genes from Six Plant Species. *Genes (Basel)* **249**, 1–17.
- 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**, 382.
- Baggs, E., Dagdas, G. & Krasileva, K. V. (2017).** NLR diversity, helpers and integrated domains: making sense of the NLR Identity. *Curr Opin Plant Biol* **38**, 59–67.
- Berkeley, M. C. (1847).** The Gardeners' Chronicle. *47*, 779.
- Bhattacharjee, S., Halane, M. K., Kim, S. H. & Gassmann, W. (2011).** Pathogen Effectors Target Arabidopsis EDS1 and Alter Its Interactions with Immune Regulators **334**, 1405–1409.
- Breen, S., Williams, S. J., Outram, M., Kobe, B. & Solomon, P. S. (2017).** Emerging Insights into the Functions of Pathogenesis-Related Protein 1. *Trends Plant Sci* **22**, 871–879. Elsevier Ltd.
- Brodersen, P. & Voinnet, O. (2006).** The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* **22**, 268–80.
- Cadle-Davidson, L., Mahanil, S., Gadoury, D. M., Kozma, P. & Reisch, B. I. (2011).** Natural infection of Run1-positive vines by naïve genotypes of *Erysiphe necator*. *Vitis* **50**, 173–175.
- Cadle-Davidson, L., Gadoury, D., Fresnedo-Ramirez, J., Yang, S., Barba, P., Sun, Q., Demmings, E. M., Seem, R. C., Schaub, M. & other authors. (2016).** Lessons from a phenotyping center revealed by the genome-guided mapping of powdery mildew resistance loci. *Phytopathology* **106**, 1159–1169.

- Campell, C. (2004).** *Phylloxera: How Wine Was Saved for the World*. London: Harpercollins.
- Century, K. S., Holubt, E. B. & Staskawicz, B. J. (1995).** *NDR1*, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6597–6601.
- Cheong, N., Choi, Y., Kim, W., Bae, I., Cho, M., Hwang, I., Kim, J. & Lee, S. (1997).** Purification and Characterization of an antifungal PR-5 Protein(PLTP) from Pumpkin Leaves. *Mol Cells* **7**, 214–223.
- Chetelat, R. T., Meglic, V. & Cisneros, P. (2000).** A Genetic Map of Tomato Based on BC 1 *Lycopersicon esculentum* x *Solanum lycopersicoides* Reveals Overall Synteny but Suppressed Recombination Between These Homeologous Genomes. *Genetics* **154**, 857–867.
- Choi, H. W. & Klessig, D. F. (2016).** DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biol* **16**, 1–10.
- Coleman, C., Copetti, D., Cipriani, G., Hoffmann, S., Kozma, P., Kovács, L., Morgante, M., Testolin, R. & Di Gaspero, G. (2009).** The powdery mildew resistance gene REN1 co-segregates with an NBS-LRR gene cluster in two Central Asian grapevines. *BMC Genet* **10**, 89.
- Coll, N. S., Epple, P. & Dangl, J. L. (2011).** Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ* **18**, 1247–56.
- Coll, N. S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., Van Breusegem, F., Dangl, J. L. & Epple, P. (2010).** Arabidopsis Type I Metacaspases Control Cell Death. *Science* **330**, 1393–1397.
- Coppinger, P., Repetti, P. P., Day, B., Dahlbeck, D., Mehlert, A. & Staskawicz, B. J. (2004).** Overexpression of the plasma membrane-localized NDR1 protein results in enhanced bacterial disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **40**, 225–237.
- Dalbó, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F., Wilcox, W. F. & Reisch, B. I. (2001).** Marker-assisted Selection for Powdery Mildew Resistance in Grapes **126**, 83–89.
- Deslandes, L. & Rivas, S. (2011).** The plant cell nucleus: A true arena for the fight between plants and pathogens. *Plant Signal Behav* **6**, 42–48.
- DeYoung, B. J. & Innes, R. W. (2006).** Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat Immunol* **7**, 1243–1249.
- Dong, X. (1998).** SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 316–323.
- Eibach, R., Zyprian, E., Welter, L. & Töpfer, R. (2007).** The use of molecular markers for

- pyramiding resistance genes in grapevine breeding **46**, 120–124.
- Eibach, R., Töpfer, R. & Hausmann, L. (2010).** Use of genetic diversity for grapevine resistance breeding. *Mitteilungen Klosterneubg* **60**, 332–337.
- Ellinghaus, D., Kurtz, S. & Willhoeft, U. (2008).** LTRharvest , an efficient and flexible software for de novo detection of LTR retrotransposons. *BMC Bioinformatics* **9**, 18.
- Ellis, J. G. & Jones, D. A. (2003).** Plant Disease Resistance Genes. In *Infect Dis Innate Immun*, pp. 27–45.
- Epple, P., Mack, A. A., Morris, V. R. F. & Dangl, J. L. (2003).** Antagonistic control of oxidative stress-induced cell death in Arabidopsis by two related , plant-specific zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6831–6836.
- European Commission. (2007).** *The use of plant protection products in the European Union. Data 1992-2003. Off Off Publ Eur Communities.*
- Feechan, A., Kabbara, S. & Dry, I. A. N. B. (2011).** Mechanisms of powdery mildew resistance in the *Vitaceae* family **12**, 263–274.
- Feechan, A., Anderson, C., Torregrosa, L., Jermakow, A., Mestre, P., Wiedemann-Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., Walker, A. R., Cadle-Davidson, L. & other authors. (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* **76**, 661–674.
- Ferrier-Cana, E., Macadré, C., Sévignac, M., David, P., Langin, T. & Geffroy, V. (2005).** Distinct post-transcriptional modifications result into seven alternative transcripts of the CC-NBS-LRR gene JA1tr of *Phaseolus vulgaris*. *Theor Appl Genet* **110**, 895–905.
- 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.
- Frenkel, O., Portillo, I., Brewer, M. T., Péros, J. P., Cadle-Davidson, L. & Milgroom, M. G. (2012).** Development of microsatellite markers from the transcriptome of *Erysiphe necator* for analysing population structure in North America and Europe. *Plant Pathol* **61**, 106–119.
- Fresnedo-Ramírez, J., Yang, S., Sun, Q., Cote, L. M., Schweitzer, P. A., Reisch, B. I., Ledbetter, C. A., Luby, J. J., Clark, M. D. & other authors. (2017).** An integrative AmpSeq platform for highly multiplexed marker-assisted pyramiding of grapevine powdery mildew resistance loci. *Mol Breed* **37**, 145-161.



- Gao, F., Shu, X., Ali, M. B., Howard, S., Li, N., Winterhagen, P., Qiu, W. & Gassmann, W. (2010).** A functional *EDS1* ortholog is differentially regulated in powdery mildew resistant and susceptible grapevines and complements an Arabidopsis *eds1* mutant. *Planta* **231**, 1037–1047.
- Gao, F., Dai, R., Pike, S. M., Qiu, W. & Gassmann, W. (2014).** Functions of *EDS1-like* and *PAD4* genes in grapevine defenses against powdery mildew. *Plant Mol Biol* **1**, 381–393.
- Gassmann, W. (2008).** Alternative splicing in plant defense. *Curr Top Microbiol Immunol* **326**, 19–33.
- Glazebrook, J. (2001).** Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis - 2001 status. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 301–308.
- Glazebrook, J. (2005).** Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 205–227.
- Grant, M., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R. & Dangl, J. (1995).** Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* **269**, 843–846.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580.
- Hanahan, D. (1985).** Techniques for Transformation of *E. coli*. In *DNA cloning A Pract Approach*, pp. 109–135.
- van Heerden, C. J., Burger, P., Vermeulen, A. & Prins, R. (2014).** Detection of downy and powdery mildew resistance QTL in a ‘Regent’ × ‘RedGlobe’ population. *Euphytica* **200**, 281–295.
- Heidrich, K., Wirthmueller, L., Tasset, C. & Pouzet, C. (2011).** Arabidopsis EDS1 Connects Pathogen Effector Recognition to Cell Compartment – Specific Immune Responses. *Science* **334**, 1401–1405.
- Hoffmann, S., Di Gaspero, G., Kovács, L., Howard, S., Kiss, E., Galbács, Z., Testolin, R. & Kozma, P. (2008).** Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine ‘Kishmish vatkana’ is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *Theor Appl Genet* **116**, 427–38.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N. & other authors. (2007).** The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**, 463–7.
- Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. (2006).** The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Kaminaka, H., Na, C., Eppele, P., Dittgen, J., Chaban, C., Holt, B. F., Merkle, T., Scha,**

- E., Harter, K. & Dangl, J. L. (2006).** bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in Arabidopsis following infection **25**, 4400–4411.
- Keogh, B. R. C., Deverall, B. J. & Mcleod, S. (1980).** Comparison of histological and physiological responses to *Phakospora pachyrhizi* in resistant and susceptible soybean. *Trans Br Mycol Soc* **74**, 329–333.
- Komárek, M., Cadková, E., Chrastny, V., Bordas, F. & Bollinger, J. C. (2010).** Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environ Int* **36**, 138–151.
- Kuczmog, A. & Horva, S. (2012).** Mapping of crown gall resistance locus *Rcg1* in grapevine. *Theor Appl Genet* **125**, 1565–1574.
- Kuhn, J. & Binder, S. (2002).** RT – PCR analysis of 5' to 3' -end-ligated mRNAs identifies the extremities of *cox2* transcripts in pea mitochondria. *Nucleic Acids Res* **30**, 439–446.
- Lebel, S., Schellenbaum, P., Walter, B. & Maillot, P. (2010).** Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family. *BMC Plant Biol* **10**, 184.
- Lee, H. & Yeom, S. (2015).** Plant NB-LRR proteins : tightly regulated sensors in a complex manner. *Brief Funct Genomics* **14**, 233–242.
- Liu, J., Chen, N., Chen, F., Cai, B., Dal Santo, S., Tornielli, G., Pezzotti, M. & Cheng, Z.-M. (2014).** Genome-wide analysis and expression profile of the bZIP transcription factor gene family in grapevine (*Vitis vinifera*). *BMC Genomics* **15**, 281.
- Livak, K. & Schmittgen, T. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(t)) Method. *Methods* **24**, 402–408.
- van Loon, L. C. & van Strien, E. a. (1999).** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* **55**, 85–97.
- Lorrain, S., Vaillau, F., Balagué, C. & Roby, D. (2003).** Lesion mimic mutants: Keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci* **8**, 263–271.
- Löytynoja, A. & Goldman, N. (2010).** webPRANK : a phylogeny-aware multiple sequence aligner with interactive alignment browser webPRANK : a phylogeny-aware multiple sequence aligner with interactive alignment browser. *BMC Bioinformatics* **11**, 579.
- Mayer, M. L., Gygi, S. P., Aebersold, R. & Hieter, P. (2001).** An Alternative RFC Complex Required for Sister Chromatid Cohesion in *S. cerevisiae* **7**, 959–970.
- Mcfadden, G. I. (1999).** Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Plant Biol* **2**, 513–519.
- Myles, S., Boyko, A. R., Owens, C. L., Brown, P. J., Grassi, F., Aradhya, M. K., Prins,**

- B., Reynolds, A., Chia, J.-M. & other authors. (2011).** Genetic structure and domestication history of the grape. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3530–3535.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. & Möisinger, E. (1995).** Pathogenesis-Related PR-1 Proteins Are Antifungal. *Plant Physiol* **108**, 17–27.
- Nishimura, M. T. & Dangl, J. L. (2010).** Arabidopsis and the Plant Immune System **61**, 1053–1066.
- Pap, D., Riaz, S., Dry, I. B., Jermakow, A., Tenschler, 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**, 170.
- Peressotti, E., Wiedemann-Merdinoglu, S., Delmotte, F., Bellin, D. & Gaspero, G. Di. (2010).** Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biol* **10**, 147.
- Peterhänsel, C., Freialdenhove, A., Kurth, J., Kolsch, R. & Schulze-Lefert, P. (1997).** Interaction Analyses of Genes Required for Resistance Responses to Powdery Mildew in Barley Reveal Distinct Pathways Leading to Leaf Cell Death. *Plant Cell* **9**, 1397–1409.
- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. & Van Wees, S. C. M. (2012).** Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 489–521.
- Qiu, W., 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**, 15020.
- Rairdan, G. J. & Moffett, P. (2006).** Distinct Domains in the ARC Region of the Potato Resistance Protein Rx Mediate LRR Binding and Inhibition of Activation. *Plant Cell* **18**, 2082–2093.
- Rapp, A. & Engel, L. (1995).** Nachweis and Bestimmung von Furaneol" (2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3-furanon) in Weinen von *Vitis vinifera*-Sorten. *Vitis* **34**, 71–72.
- Rapp, A. & Versini, G. (1996).** Vergleichende Untersuchungen zum Gehalt von Methylantranilat ( Foxton ") in Weinen von neueren pilzresistenten Rebsorten and *Vitis vinifera*-Sorten. *Vitis* **35**, 215–216.
- Sekhwal, M. K., Li, P., Lam, I., Wang, X., Cloutier, S. & You, F. M. (2015).** Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. *Int J Mol Sci* **16**, 19248–19290.
- Spoel, S. H. & Dong, X. (2012).** How do plants achieve immunity? Defence without

- specialized immune cells. *Nat Rev Immunol* **12**, 89–100.
- This, P., Lacombe, T. & Thomas, M. R. (2006).** Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet* **22**, 511–519.
- Thomma, B. P. H. J., Penninckx, I. A. M. A., Broekaert, W. F. & Cammue, B. P. A. (2001).** The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr Opin Immunol* **13**, 63–68.
- Töpfer, R., Hausmann, L., Eibach, R., Adam-Blondon, A. F. & Martinez-Zapater, J. M. (2011).** Molecular breeding. 160–185. Science Publishers, Inc.
- Wang, J., Shine, M. B., Gao, Q.-M., Navarre, D., Jiang, W., Liu, C., Chen, Q., Hu, G. & Kachroo, A. (2014a).** Enhanced Disease Susceptibility1 Mediates Pathogen Resistance and Virulence Function of a Bacterial Effector in Soybean. *Plant Physiol* **165**, 1269–1284.
- Wang, L., Wei, J., Zou, Y., Xu, K., Wang, Y. & Cui, L. (2014b).** Molecular Characteristics and Biochemical Functions of VpPR10s from *Vitis pseudoreticulata* Associated with Biotic and Abiotic Stresses. *Int J Mol Sci* **15**, 19162–19182.
- 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**, 359–374.
- Welter, L. J., Tisch, C., Kortekamp, A., Töpfer, R. & Zyprian, E. (2017).** Powdery mildew responsive genes of resistant grapevine cultivar 'Regent'. *VITIS - J Grapevine Res* **56**, 181–188.
- Wilcox, W. F., Gubler, W. D. & Uyemoto, J. K. (2015).** *Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests - Second Edition.*
- Yang, S., Fang, T. & Zhu, H. (2014).** Alternative Splicing in Plant Immunity. *Int J Mol Sci* **15**, 10424–10445.
- Yu, Z., Liuying, W., Aiguo, Y., Chenggang, L., Lirui, C., Caihong, J., Aixia, C., Wei, L., Jing, Z. & other authors. (2017).** Development and application of a molecular marker for TMV resistance based on N gene in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Euphytica* **213**, 259.
- 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**, 68-91.
- Zhang, C., Gong, P., Wei, R., Li, S., Zhang, X., Yu, Y. & Wang, Y. (2013).** The

metacaspase gene family of *Vitis vinifera* L.: Characterization and differential expression during ovule abortion in stenospermocarpic seedless grapes. *Gene* **528**, 267–276.

**Zhou, Y., Massonnet, M., Sanjak, J. S., Cantu, D. & Gaut, B. S. (2017).** Evolutionary genomics of grape (*Vitis vinifera* ssp. *vinifera*) domestication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 11715–11720.

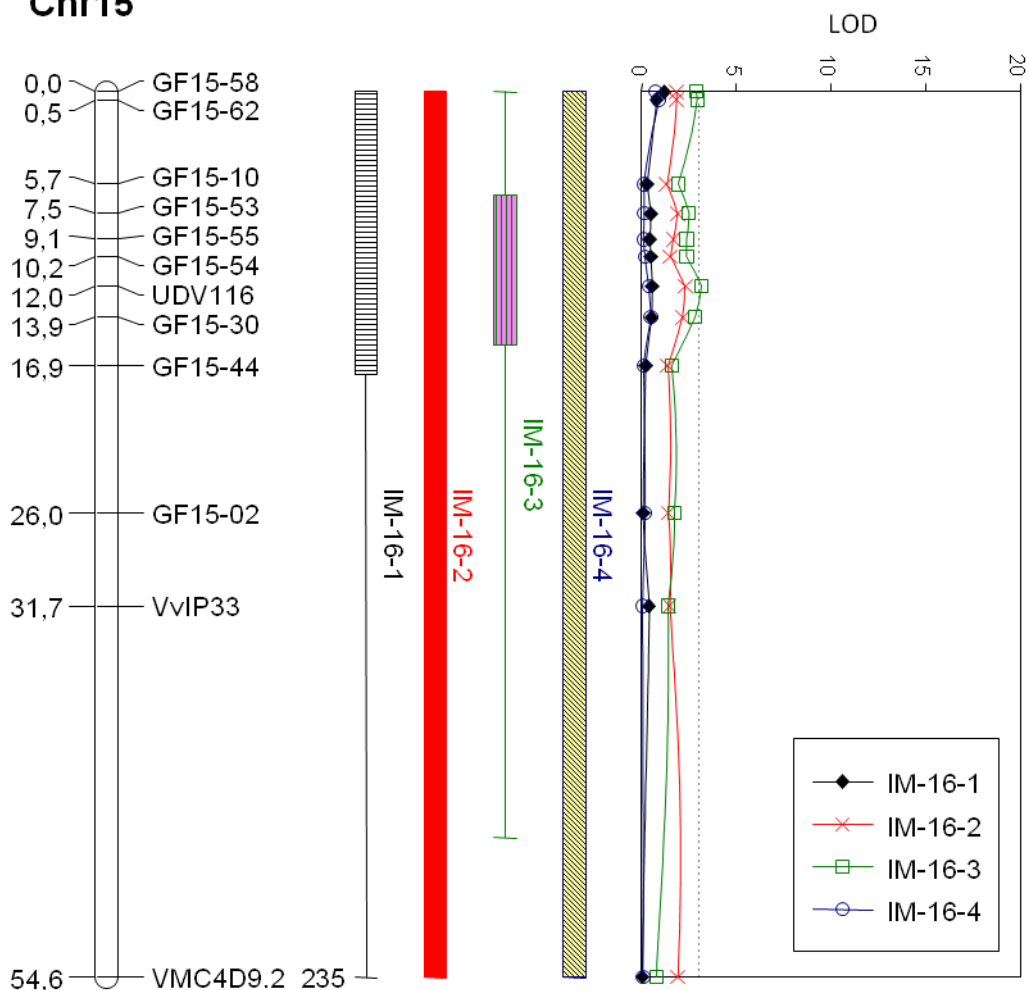
**Zhu, S., Jeong, R. D., Venugopal, S. C., Lapchyk, L., Navarre, D. R., Kachroo, A. & Kachroo, P. (2011).** Sag101 forms a ternary complex with EDS1 and PAD4 and is required for resistance signaling against turnip crinkle virus. *PLoS Pathog* **7**, e1002318

**Zyprian, E. & Kado, C. (1990).** Agrobacterium-mediated plant transformation by novel mini-T vectors in conjunction with a high-copy vir region helper plasmid. *Plant Mol Biol* **15**, 245–256.

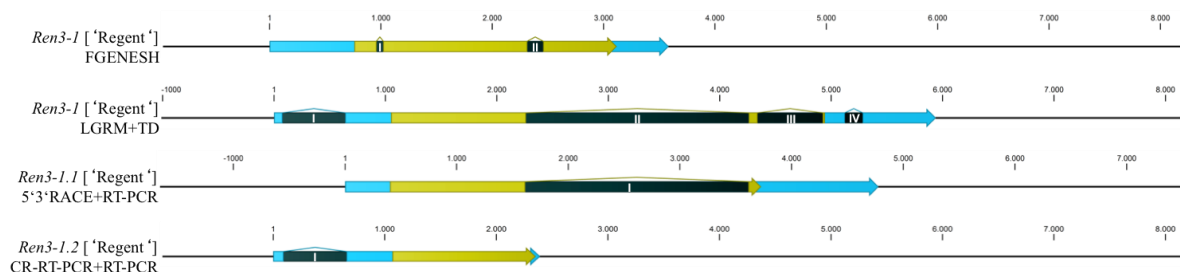
**Zyprian, E., Ochßner, I., Schwander, F., Šimon, S., Hausmann, L., Bonow-Rex, M., Moreno-Sanz, P., Grando, M. S., Wiedemann-Merdinoglu, S. & other authors. (2016).** Quantitative trait loci affecting pathogen resistance and ripening of grapevines. *Mol Genet Genomics* **291**, 1573–1594.

Anhang

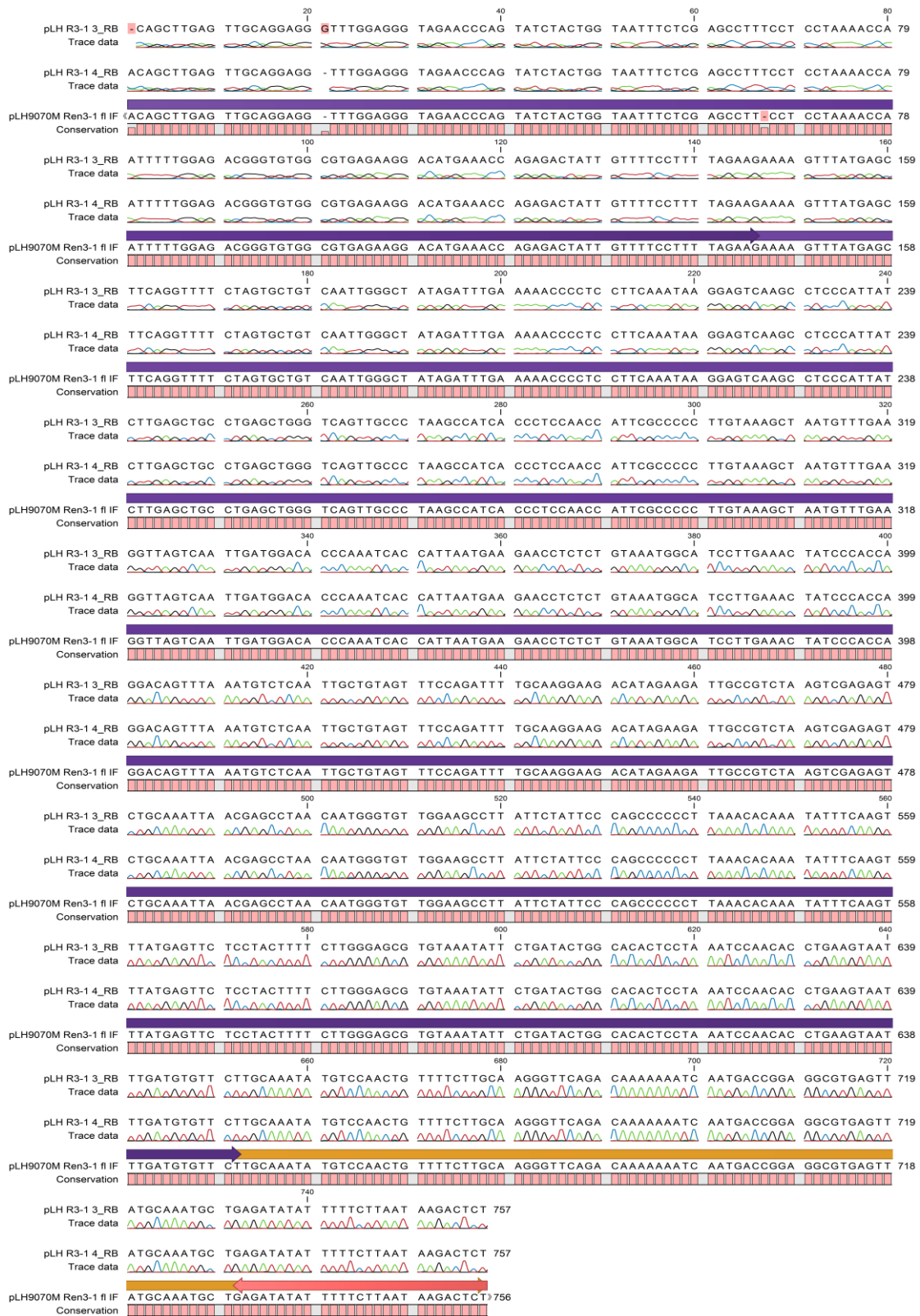
'Cabernet Sauvignon'  
Chr15



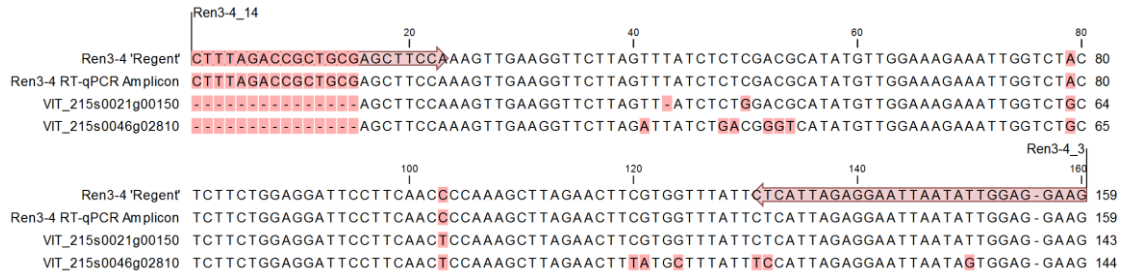
**Abbildung 60:** QTL-Analyse für Resistenz gegen *E. necator* in der Vegetationsperiode 2016 in der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon'. Links ist die genetische Karte von Chromosom 15 der 'Cabernet Sauvignon' Haplophase dargestellt. In die LOD Graphen wurde IM und MQM aufgetragen. Das Konfidenzintervall  $LOD \pm 1$  ist durch einen Kasten und  $LOD \pm 2$  durch Whisker links neben dem Graphen markiert.



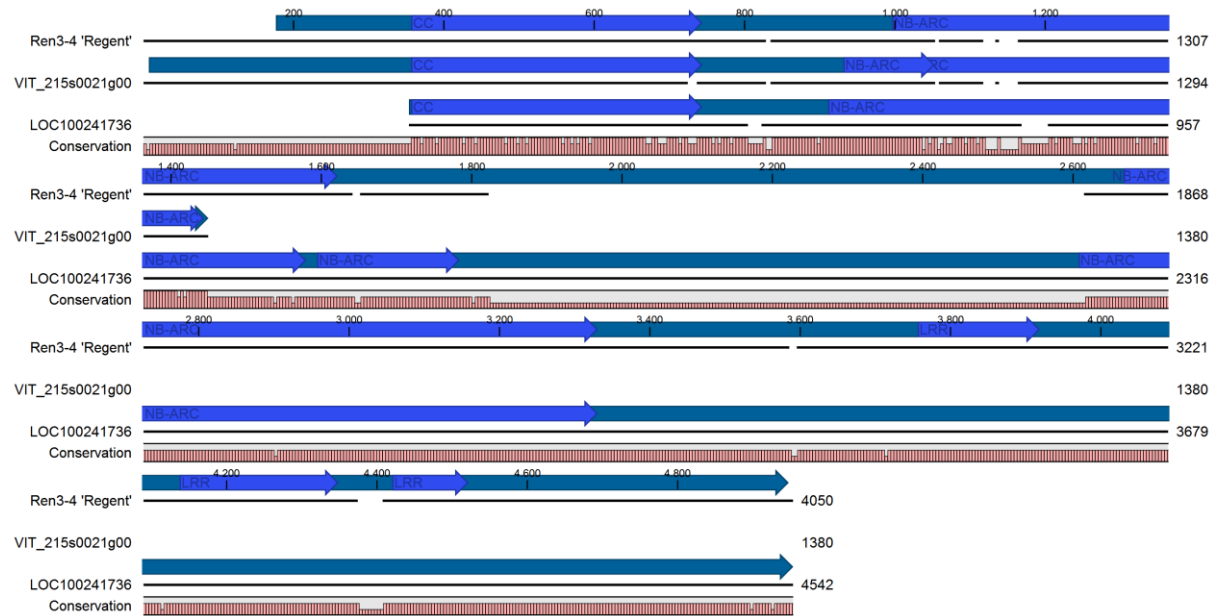
**Abbildung 61:** Übersicht der vorhergesagten und experimentell nachgewiesenen Transkripte von *Ren3-1* aus 'Regent'. Es wurde jeweils die mRNA (blau), die CDS (gelb) und die gefundenen Introns (schwarz) eingezeichnet.



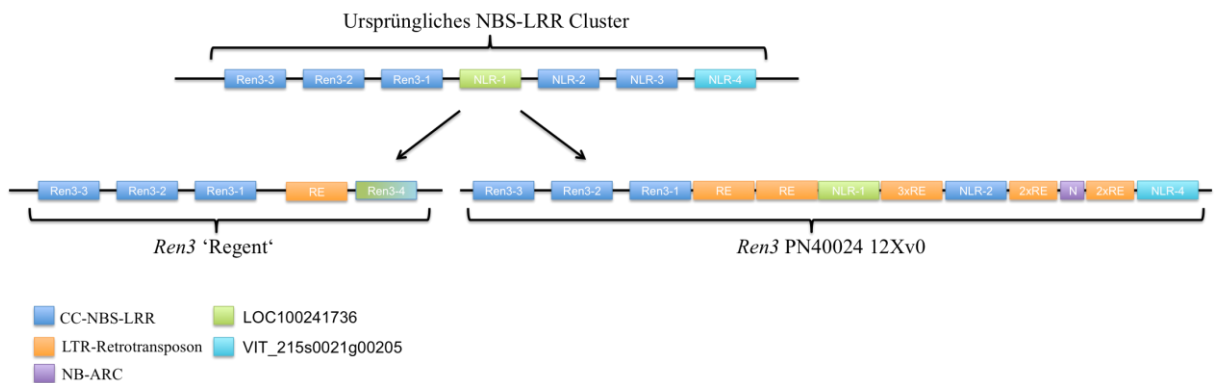
**Abbildung 62:** End Sequenzierung der beiden pLH9070-Ren3-1\_IF #3 und #4 Klone. Es wurde die detektierte cDNA (lila), das Insert (orange) und das Amplifikation Oligonukleotid (rot) eingezeichnet. Zusätzlich wurde die Übereinstimmung (Conservation Barplot) und die Sequenzier „Trace Data“ angegeben.



**Abbildung 63:** Alignment des *Ren3-4* RT-qPCR Amplicons mit *Ren3-4* aus 'Regent' und den beiden gefundenen Homologen auf Chromosom 15 von PN40024 12Xv0.

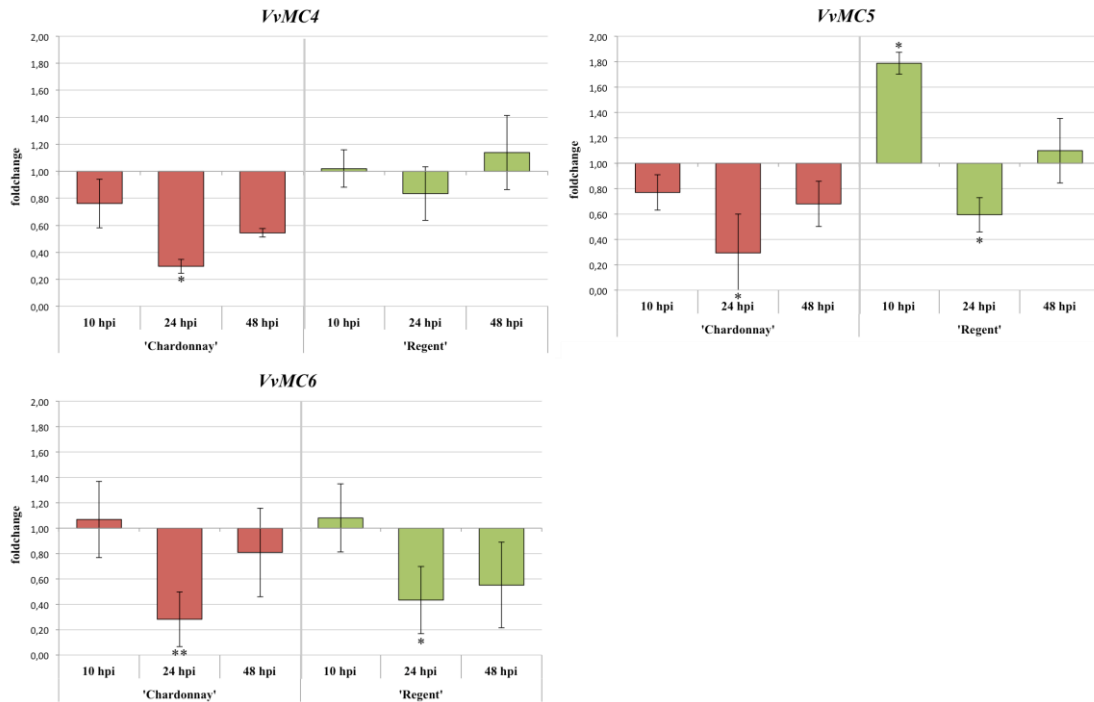


**Abbildung 64:** Sequenzalignment von *Ren3-4* aus 'Regent' und den beiden flankierenden RGAs aus PN40024 12Xv0. Annotierte Gene (dunkel blau) und funktionelle Domänen (hell blau) wurden eingezeichnet. Unter dem Alignment wurde die Übereinstimmung der Sequenzen in einem Balkendiagramm angegeben.

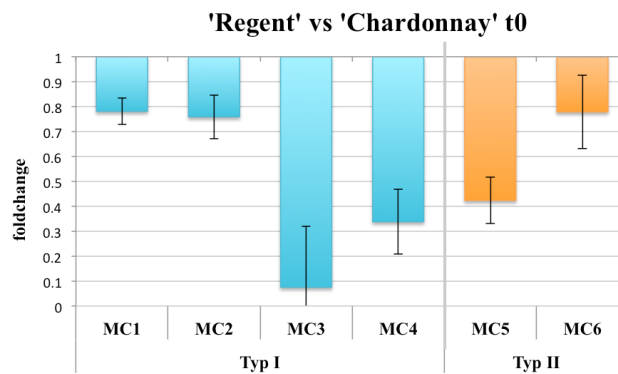


**Abbildung 65:** Mögliche Entstehung von *Ren3* in 'Regent' und 'Spätburgunder' anhand der gefundenen NBS-LRR Gene und LTR Retrotransposons.





**Abbildung 66:** RT-qPCR Ergebnisse für *VvMC4*, *VvMC5* und *VvMC6* nach Inokulation mit *E. necator* für die beiden Genotypen 'Chardonnay' und 'Regent'. Der Standardfehler der technischen Wiederholungen ist als Fehlerbalken angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede zum Zeitpunkt vor der Inokulation sind mit Sternchen versehen (\*  $\alpha = 0,01 - 0,05$ ; \*\*  $\alpha = 0,001 - 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$ ).



**Abbildung 67:** RT-qPCR Ergebnisse für die sechs untersuchten Metacaspasen von *V. vinifera*. Der angegebene Foldchange wurde mit der  $\Delta\Delta C_t$  berechnet. Der T0  $\Delta\Delta C_t$  von 'Regent' wurde dabei relative zur Expression von 'Chardonnay' berechnet um Unterschiede in der basalen Expression zwischen den beiden Genotypen darstellen zu können.

**Tabelle 28:** Oligonukleotide welche für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet wurden.

Anwendung	Name	Sequenz 5' – 3'	Referenz
<b>amiRNA</b>	R3 1_1 I miR s	<u>GATAACTTCATGCGGGTTCGCTT</u> TCTCTCTTT GTATTCC	
	R3 1_1 II miR a	<u>GAAAGCGAACCCGCATGAAGTTA</u> TCAAAGAGA ATCAATGA	
	R3 1_1 III miR*s	<u>GAAAACGAAACCCGCAAGAAGTTT</u> TCACAGGTC GTGATATG	
	R3 1_1 IV miR*a	<u>GAAAACCTTCTTGCGGGTTCGTTTT</u> TCTACATATA TATTCTT	
	R3 1_2 I miR s	<u>GATATTGTAGACTTTTTTCGCAA</u> TCTCTCTTT GTATTCC	
	R3 1_2 II miR a	<u>GATTGCGAAAAAAGTCTACAATA</u> TCAAAGAGA ATCAATGA	
	R3 1_2 III miR*s	<u>GATTACGAAAAAAGTGTACAATT</u> TCACAGGTC GTGATATG	
	R3 1_2 IV miR*a	<u>GAAATGTACACTTTTTTCGTAA</u> TCTACATATA TATTCTT	
	A pRS300	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	
	B pRS300	GCGGATAACAATTCACACAGGAAACA G	
<b>In-Fusion</b>	Ren3-1_Fl if f	<u>CCAGTGACCTGCATGAATT</u> TCATATCACGTGGG TTGTCTC	
	Ren3-1_8 if r	<u>GCCTGTCGACATCGATAAGCT</u> GCAGAGTCTTA TTAAGAAAAATATATCTC	
<b>Ren3-1</b>	Ren3-1_1	CGTTGATATTTTTTTTTTTGCAACCCT	
	Ren3-1_2	CTTTTACTCCCTATGTTTTCTGGATA	
	Ren3-1_3	AGAAATATCGGCGATATTTTCGG	
	Ren3-1_4	GACCTCTTCAATTAATTCTTTGCT	
	Ren3-1_5	ACATATGAGCCCCTAAATAATC	
	Ren3-1_6	CAGTTTCCATGTAGGAACACTTCATAGAGAA	
	Ren3-1_7	GAAAAATGCCGATCTCAAAAAGTTTTG	
	Ren3-1_8	GCAGAGTCTTATTAAGAAAAATATATCTC	
	Ren3-1_9	CTCAAAAAGTTTTGTATCTCTGGCCT	
	Ren3-1_10	CAGATGCCAATCTATACTTGCAAGT	
	ORF5_seq4	GATGGTATGGAGGTGGTGAA	
	ORF5_seq5	TGGGAGCTCTTCTCAAGAA	
	ORF5_seq6	AGGCCAGAGATACAAAACCT	
	RPP8 1	CTCGATTGAGATGCCAATC	
	RPP8 2	AAGCGTACTCTATCAATTCCC	
<b>Ren3-2</b>	Ren3-2_1	TTTTCAATTTTCGTACCATATGAACCT	
	Ren3-2_2	GTTTGGAGAGGTAGAAGGGCAGGTA	
	Ren3-2_3	TGAGTGATTGTTATGTTATATAAGAC	
	Ren3-2_4	GATTGGACAGATGCTCCATATGCG	
	Ren3-2_for	GGTGGTAAGTGGATTAACAATG	
	Ren3-2_rev	ACATTGAAGCATAGTTGTGAC	
	RPP8 like7 5'	AATTAGCACTCTACTTCCATATCCC	
	RPP8 like7 3'	GGCTTAGCATTACAGCAGAG	
	RPP8 like7 f	CCCAGCACTTCTGAAGC	
	RPP8 like7 r	ACCATCTAATTCTGTATGATTC	
<b>Ren3-3</b>	Ren3-3_1	GTTGTTAGAGGGAGAGAGTGAGG	
	Ren3-3_2	TCTCTTGCAATCGTGGTCTCGGACT	
	Ren3-3_3	GTGCAGCAGTACTGACATGGTCAAGTT	
	Ren3-3_5'	GTCGGTGAGAGTCATGATACAACATG	
	Ren3-3 f	ATAAAAATCTAAGTTCATATGGTACG	
	Ren3-3 r	CGAAGTGGATAGAGATGCATG	
	RPP8 like8 3'	TTTGCTTGGGATCGCTAG	
<b>Ren3-4</b>	Ren3-4_1	CCAGTTCCTAGAACATGCGGAC	
	Ren3-4_2	TGGTCTTTTCAAATCTTCAATTAATCTA	
	Ren3-4_3	CTTCTCCAATATTAATTCCTCTAATGAG	
	Ren3-4_4	CCCAAAGCTTAGAACTTCGTGGTTTATTCT	
	Ren3-4_5	CGGTTTCACAACAAGCCTCGTCTA	
	Ren3-4_6	CGCCCATTGAGCTCATTCAACAAGCC	
	Ren3-4_7	CGATGTTCCGGCACCCTTGC	
	Ren3-4_8	GGTTTATAAATGTCTCCGGGAAAAG	
	Ren3-4_9	CACAAGCACTTATATATAGACTTCGTAGC	

	Ren3-4_10	TATCTCTGAAAGATCTGACACAAGACTT	
	Ren3-4_11	CTTTTCCCGGAGACATTTATAAAACC	
	Ren3-4_12	GCAAGTGGTGCCGAACATCG	
	Ren3-4_13	CTTTGGAAGCTCGCAGCGG	
	Ren3-4_14	CTTTAGACCGCTGCGAGCTTCCA	
	RPP8_4_for	CAAAAACCAACTAGAGCAACC	
	RPP8_4_rev	TCCCCTCGCCTATATAAAACC	
<b>3'RACE</b>	3'RACE	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTTTTTTTTT TT	Clontech, SMARTer RACE cDNA Amplification Kit
	3'RACE 1	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC	
<b>5'RACE</b>	18SrRNA f	GATTTTCGGTCTATTCTGTTGG	
<b>RT-qPCR</b>	VvbZIP9 f	GCTTCGCTCTCAAGTATGGG	Liu <i>et al.</i> , 2014
	VvbZIP9 r	TGGAGGACTGGGAATCAATGG	Liu <i>et al.</i> , 2014
	VvbZIP21 f	CCCACTGAAAGCCTACTGAATG	Liu <i>et al.</i> , 2014
	VvbZIP21 r	GGAGAGACCAGCACCTACC	Liu <i>et al.</i> , 2014
	VvEDS1 f	AGGGTTTTATATTGTTATCTCAAGGC	Gao <i>et al.</i> , 2014
	VvEDS1 r	GGAAGAAAATATCTTATTACTACATAATGTTTCA	Gao <i>et al.</i> , 2014
	VvEDL1 f	GAGCTTCCGGTGTCTTCTG	Gao <i>et al.</i> , 2014
	VvEDL1 r	CTCGGCCTTTTCCTTATACTCA	Gao <i>et al.</i> , 2014
	VvEDL2 f	GCTGGATCTTGGCTTCGC	Gao <i>et al.</i> , 2014
	VvEDL2 r	AACTTGCTTCTTCTCTCCAATTAC	Gao <i>et al.</i> , 2014
	VvEDL5 f	CACTTGGCCTACCAATTAAGA	Gao <i>et al.</i> , 2014
	VvEDL5 r	GCTTGAAGGCATAGCATGG	Gao <i>et al.</i> , 2014
	VvLOL1 f	GTGGAGCAACAAGTGTACAGTG	
	VvLOL1 r	CAACAGCATCCGGCAATTCC	
	VvLSD1 f	CAATCTCTGCATCAACACCCTCT	
	VvLSD1 r	ACTCCAACAACAACATTGCTAACC	
	VvMC1 f	ACCTCTTCTCATGGGGTTAAG	Zhang <i>et al.</i> , 2013
	VvMC1 r	TGTCCACTCCTGCTCATTCTG	Zhang <i>et al.</i> , 2013
	VvMC2 f	TGGGGAGGTCATTTCTTTAG	Zhang <i>et al.</i> , 2013
	VvMC2 r	GGTTGATCGCATTGAATTAGC	Zhang <i>et al.</i> , 2013
	VvMC3 f	CCCTACTCTCCGCTTACCA	Zhang <i>et al.</i> , 2013
	VvMC3 r	GCGTCATTTACAGACCCCTTC	Zhang <i>et al.</i> , 2013
	VvMC4 f	CTCGGAAAAGGGCAAGCATA	Zhang <i>et al.</i> , 2013
	VvMC4 r	GGTTGAAGCATCTCCCTCGTA	Zhang <i>et al.</i> , 2013
	VvMC5 f	GAGGGTTGCCGCATTACGA	Zhang <i>et al.</i> , 2013
	VvMC5 r	GCACCTTGCACGGTTTGGT	Zhang <i>et al.</i> , 2013
	VvMC6 f	GACATGAATCCAATGATGACCG	Zhang <i>et al.</i> , 2013
	VvMC6 r	CCGACTGCTGCTTGGAAAACC	Zhang <i>et al.</i> , 2013
	VvNDR1 f	GGTTCCGATTGGCTGAAGTA	Dissertation Moser, 2014
	VvNDR1 r	CACATTTTCGTTTCCCTTTTCG	Dissertation Moser, 2014
	VvNPR1 f	GGCTGCAGAACTGCATCTTT	Dissertation Moser, 2014
	VvNPR1 r	TTGGAAAACCATGTACAGGTAGG	Dissertation Moser, 2014
	VvPR1 f	TCACATGCAACTACGATCCA	Dissertation Moser, 2014
	VvPR1 r	TCACCATGCTCTAACAGTACCC	Dissertation Moser, 2014
	VvPR5 f	GATAGGTGTCCGGTGGCTTA	Dissertation Moser, 2014
	VvPR5 r	GGGCATGTAAAGGTGCTTGT	Dissertation Moser, 2014
	VvPR10 f	GCACATCCCGATGCCTATTAAG	Dissertation Moser, 2014
	VvPR10 r	ACTTACTGAGACTGATAGATGCAATGAATA	Dissertation Moser, 2014

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Leuten bedanken die mich unterstützt und dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit in dieser Form existiert:

- Prof. Dr. Eva Zyprian für die Betreuung der durchgeführten Doktorarbeit, die stete Unterstützung bei schwierigen Fragestellung und die Übernahme der Erstkorrektur.
- Prof. Dr. Reinhard Töpfer für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit im Institut für Rebenzüchtung durchführen zu können und für Problemlösungsansätze und Ideen die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.
- Dr. Rudolf Eibach und Dr. Oliver Trapp für die wertvollen Informationen über rekombinante Genotypen aus Züchtungen und aus dem Sortiment.
- Dr. Margit Harst und dem ganzen *in vitro* Team für die Transformationen und die damit verbundene Materialschlacht.
- Dr. Florian Schwander für konstruktiven Diskussionen und Hilfe jeglicher Art.
- Pierre Schneider für die gemeinsame Zusammenarbeit während der Doktorarbeit.
- Dr. Ludger Hausmann für die Bereitstellung von NGS-Daten, die die Markerentwicklung um einiges erleichterten.
- Dr. Erika Maul für die aufschlussreiche ampelographische Hilfe.
- Margit Schneider für die Unterstützung im Labor, falls es mal zu viel wurde.
- Claudia Welsch für ihre Unterstützung im Labor, ihre Bestell-Expertise und ihr Gedächtnis.
- Carina Mook für Hilfe bei etlichen Fragen im Labor.
- Ulla Müller für den EDV-Support.
- Heike Bennek, Dagmar Andrä, Margrit Daum und allen anderen Mitarbeiterinnen im Labor für die Hilfe.
- Willi Gläsen und Sabine Hieb-Gläsen für die jährliche Holzbeschaffungen.
- Hiltrud Heupel und Nina Adam für die Hilfe bei der Beschaffung von fehlender Literatur.
- Anita Heck, Sabine Martin und allen anderen Mitarbeiterinnen in der Verwaltung für die Unterstützung bei verwaltungstechnischen Fragen.
- Eberhardt Corfier und seinem Team für die Pflege der Gewächshauspflanzen.
- Dr. Anna Kicherer, Anna Werner, Sarah Fröbel, Anna Markheiser, Dr. Franco Röckel und allen anderen Doktoranden für eine Gute Zeit.
- Nicolai Haag, Florian Rist, Robert Richter, Moritz Cappel, Ulrike Braun und Janine Köckerling für die unvergessliche gemeinsame Zeit abseits der Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Sabine und Fritz Zendler für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre uneingeschränkte Unterstützung. Dieser Dank gilt ebenfalls meiner gesamten Familie, dank deren Verständnis und Unterstützung ich dieses Ziel erreicht habe.



