

# Inhaltsverzeichnis

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| Abbildungsverzeichnis | xii |
|-----------------------|-----|

|                     |    |
|---------------------|----|
| Tabellenverzeichnis | xv |
|---------------------|----|

|             |      |
|-------------|------|
| Abkürzungen | xvii |
|-------------|------|

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 Einleitung</b>                                                               | <b>1</b>  |
| 1.1 Die Weinrebe                                                                  | 1         |
| 1.1.1 Bedeutende Pathogene der Weinrebe                                           | 1         |
| 1.1.2 <i>Plasmopara viticola</i> , der Erreger des Falschen Mehltaus der Weinrebe | 1         |
| 1.1.3 Bekämpfungsstrategien gegen <i>P. viticola</i>                              | 5         |
| 1.2 Pathogen-Pflanze-Interaktion                                                  | 5         |
| 1.2.1 Pflanzliche Resistenz                                                       | 5         |
| 1.2.2 Pathogenerkennung                                                           | 6         |
| 1.2.3 Pflanzliche Sekundärmetabolite - Stressmetabolite                           | 7         |
| 1.3 Resistenzzüchtung bei Reben                                                   | 10        |
| 1.4 Der <i>Rpv10</i> -Lokus                                                       | 11        |
| 1.5 Ziel der Arbeit                                                               | 12        |
| <b>2 Material und Methoden</b>                                                    | <b>15</b> |
| 2.1 Material                                                                      | 15        |
| 2.1.1 Software und Datenbanken                                                    | 16        |
| 2.1.2 Geräte                                                                      | 17        |
| 2.1.3 Kits                                                                        | 18        |
| 2.1.4 Enzyme, Antibiotika und andere Substanzen                                   | 19        |
| 2.1.5 Vektor                                                                      | 20        |
| 2.1.6 Bakterienstämme und BAC-Klone                                               | 20        |
| 2.1.7 Pflanzennmaterial                                                           | 21        |
| 2.1.8 Nährmedien                                                                  | 22        |
| 2.1.9 Färbelösungen                                                               | 22        |
| 2.1.10 Puffer                                                                     | 23        |
| 2.1.11 Isolation von Plasmid-DNA nach Birnboim and Doly (1979)                    | 23        |
| 2.2 Methoden                                                                      | 24        |
| 2.2.1 Bioinformatische Analyse der Kandidatengensequenzen                         | 24        |
| 2.2.2 Blattscheiben Tests                                                         | 27        |
| 2.2.3 Trypanblau-Lebend-Färbung                                                   | 27        |
| 2.2.4 Anilin-Blau-Färbung                                                         | 28        |
| 2.2.5 Calcofluor White Färbung                                                    | 28        |
| 2.2.6 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) Färbung                                | 28        |
| 2.2.7 Mikroskopie                                                                 | 28        |

|          |                                                                                                                                                          |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.8    | Analyse von Winterknospen . . . . .                                                                                                                      | 29        |
| 2.2.9    | Extraktion von Nukleinsäuren . . . . .                                                                                                                   | 30        |
| 2.2.10   | Decapping von mRNAs . . . . .                                                                                                                            | 32        |
| 2.2.11   | RNA-Ligation . . . . .                                                                                                                                   | 32        |
| 2.2.12   | cDNA-Synthese . . . . .                                                                                                                                  | 33        |
| 2.2.13   | Amplifikation der Kandidatengene . . . . .                                                                                                               | 34        |
| 2.2.14   | Klonierung der Kandidatengene - In-Fusion® HD Cloning . . . . .                                                                                          | 36        |
| 2.2.15   | 3'-RACE-PCR . . . . .                                                                                                                                    | 36        |
| 2.2.16   | 5'-RACE-PCR . . . . .                                                                                                                                    | 37        |
| 2.2.17   | Circularized Reverse Transcription PCR (CR-RT-PCR) . . . . .                                                                                             | 38        |
| 2.2.18   | RNA-Seq-Analyse . . . . .                                                                                                                                | 38        |
| 2.2.19   | Der <i>Rpv10</i> -Lokus und seine Gene in der RNA-Seq-Analyse . . . . .                                                                                  | 39        |
| 2.2.20   | qRT-PCR . . . . .                                                                                                                                        | 39        |
| 2.2.21   | Stilben-Analyse . . . . .                                                                                                                                | 40        |
| 2.2.22   | Berechnung der Myzelfläche im Vergleich zwei und sieben Tage nach Inokulation . . . . .                                                                  | 43        |
| 2.2.23   | Triparentales Mating . . . . .                                                                                                                           | 44        |
| 2.2.24   | Transformation in Kalli verschiedener anfälliger <i>Vitis</i> -Genotypen . . . . .                                                                       | 45        |
| 2.2.25   | Selektion regenerierter Keimlinge . . . . .                                                                                                              | 46        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                                                                                                        | <b>49</b> |
| 3.1      | Bioinformatische Analyse der Kandidatengensequenzen . . . . .                                                                                            | 49        |
| 3.1.1    | Kernimportsignale (NLS) . . . . .                                                                                                                        | 50        |
| 3.1.2    | Nucleotide Binding Site (NBS) Motive . . . . .                                                                                                           | 51        |
| 3.1.3    | Leucine Rich Repeat (LRR) Motive . . . . .                                                                                                               | 51        |
| 3.1.4    | Motive von Peptidsegmenten in Nucleotide Binding Sites (NBS) . . . . .                                                                                   | 53        |
| 3.1.5    | Vergleich des anfälligen und resistenten Haplotypen des Kandidatengens <i>Rpv10</i> #1 - Unterschiede in der DNA-Sequenz zur Aminosäuresequenz . . . . . | 54        |
| 3.1.6    | Promotor-Analysen . . . . .                                                                                                                              | 58        |
| 3.2      | Kandidatengene . . . . .                                                                                                                                 | 58        |
| 3.2.1    | Klonierung der Kandidatengene . . . . .                                                                                                                  | 58        |
| 3.2.2    | 3'-RACE-Analyse . . . . .                                                                                                                                | 60        |
| 3.2.3    | 5'-RACE-Analyse . . . . .                                                                                                                                | 60        |
| 3.2.4    | CR-RT-PCR . . . . .                                                                                                                                      | 61        |
| 3.3      | RNA-Seq-Analyse . . . . .                                                                                                                                | 62        |
| 3.3.1    | Anzahl der differentiell exprimierten Gene (DEGs) . . . . .                                                                                              | 62        |
| 3.3.2    | Cluster-Analyse und Einteilung nach Gene Ontology (GO) . . . . .                                                                                         | 64        |
| 3.3.3    | Gene auf Chromosom 16 . . . . .                                                                                                                          | 65        |
| 3.3.4    | Die Gene des <i>Rpv10</i> -Lokus in der RNA-Seq-Analyse . . . . .                                                                                        | 70        |
| 3.4      | Validierung der RNA-Seq-Analyse mittels qRT-PCR . . . . .                                                                                                | 73        |
| 3.5      | Mikroskopie . . . . .                                                                                                                                    | 76        |
| 3.5.1    | Anilin-Blau-Färbung . . . . .                                                                                                                            | 76        |
| 3.5.2    | Nachweis von Superoxiden - NBT-Färbung . . . . .                                                                                                         | 82        |
| 3.5.3    | Nachweis von Stilbenen in der Mikroskopie . . . . .                                                                                                      | 82        |
| 3.5.4    | Berechnung der Myzelfläche im Vergleich zwei und sieben Tage nach Inokulation . . . . .                                                                  | 82        |
| 3.5.5    | Analyse von Winterknospen . . . . .                                                                                                                      | 85        |
| 3.5.6    | Histologische Studien mit <i>P. viticola</i> . . . . .                                                                                                   | 86        |

|          |                                                                                          |            |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.6      | Stilben-Analyse . . . . .                                                                | 92         |
| 3.6.1    | Stilben-Analysen an verschiedenen <i>Rpv</i> -Trägern . . . . .                          | 92         |
| 3.7      | Transformation in anfällige <i>in vitro</i> Reben . . . . .                              | 97         |
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b>                                                                        | <b>101</b> |
| 4.1      | Elektronentransport und Metabolite - Erste Instanz der Pathogenabwehr . . . . .          | 101        |
| 4.1.1    | RNA-Seq-Analyse . . . . .                                                                | 102        |
| 4.1.2    | Regulation ausgewählter Transkriptionsfaktoren - qRT-PCR . . . . .                       | 102        |
| 4.1.3    | Nachweis der Induktion von <i>STS</i> -Genen . . . . .                                   | 103        |
| 4.1.4    | Stilben-Analyse mittels HPLC . . . . .                                                   | 103        |
| 4.1.5    | Mikroskopie . . . . .                                                                    | 104        |
| 4.2      | Die Kandidatengene des <i>Rpv10</i> -Lokus - Zweite Instanz der Pathogenabwehr . . . . . | 105        |
| 4.2.1    | Das Kandidatengen <i>Rpv10#1</i> . . . . .                                               | 105        |
| 4.2.2    | Das Kandidatengen <i>Rpv10#2</i> . . . . .                                               | 107        |
| 4.2.3    | Die Kandidatengene in der RNA-Seq-Analyse . . . . .                                      | 108        |
| 4.3      | Pathogenkolonisierung und Überwinterung . . . . .                                        | 109        |
| <b>5</b> | <b>Schlussfolgerungen und Ausblick</b>                                                   | <b>111</b> |
| <b>6</b> | <b>Danksagungen</b>                                                                      | <b>113</b> |
|          | <b>Literaturverzeichnis</b>                                                              | <b>115</b> |
| <b>A</b> | <b>Anhang</b>                                                                            | <b>133</b> |
| A.1      | Tabellen . . . . .                                                                       | 134        |
| A.2      | Abbildungen . . . . .                                                                    | 140        |
| <b>B</b> | <b>Selbstständigkeitserklärung</b>                                                       | <b>143</b> |
| <b>C</b> | <b>Über die Autorin</b>                                                                  | <b>145</b> |
| C.1      | Lebenslauf . . . . .                                                                     | 145        |
| C.2      | Publikationen . . . . .                                                                  | 145        |