

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| Abbildungen..... | V |
| Tabellen | XII |
| Abkürzungen | XIV |
| Zusammenfassung..... | XVI |
| Abstract | XVII |
| I Einleitung..... | 1 |
| I.1 Die Weinrebe <i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>vinifera</i> | 1 |
| I.2 Die wichtigsten Pathogene der Weinrebe | 2 |
| I.3 Resistenzzüchtung bei der Weinrebe | 3 |
| 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 |
| I.6 Zielsetzung..... | 8 |
| II Material und Methoden | 10 |
| II.1.1 Material..... | 10 |
| 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 |
| II.1.2 Pflanzenmaterial und <i>E. necator</i> Sporen..... | 13 |
| 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 |
| II.2 Methoden..... | 14 |
| II.2.1 Resistenzbonitur | 14 |
| II.2.1.1 Freiland | 14 |
| II.2.1.2 „Detached leaf assay“ | 15 |
| II.2.2 Färbemethoden | 15 |
| II.2.2.1 Trypanblau-Färbung..... | 15 |

| | |
|--|-----------|
| II.2.2.2 Calcofluor White Färbung | 15 |
| II.2.3 DNA Extraktion..... | 16 |
| II.2.3.1 Einzelaufreinigung | 16 |
| II.2.3.2 96 Well Extraktion | 16 |
| II.2.4 Erstellung von Oligonukleotiden für PCR Reaktionen | 16 |
| II.2.5 Design von genetischen Markern | 17 |
| II.2.5.1 SSR-Marker | 17 |
| II.2.5.2 InDel-Marker | 17 |
| II.2.5 PCR..... | 17 |
| II.2.5.1 Kapa HiFi Hot-start..... | 17 |
| II.2.5.2 Phusion HiFi | 18 |
| II.2.5.3 Kapa2G Multiplex Mix..... | 18 |
| II.2.6 Fragmentlängenanalyse | 18 |
| II.2.6.1 Gelelektrophorese | 18 |
| II.2.6.2 Kapillarsequenzierer | 19 |
| II.2.7 Erstellen von genetischen Karten | 19 |
| II.2.8 QTL-Analyse..... | 20 |
| II.2.9 Statistische Analysen..... | 20 |
| II.2.9.1 Paardifferenztest..... | 20 |
| II.2.10 Klonierung von PCR-Fragmenten | 20 |
| 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 |
| II.2.11 RNA Extraktion..... | 28 |
| II.2.12 Entfernen der Cap Struktur von mRNAs | 29 |
| II.2.12.1 Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) | 29 |
| II.2.12.2 RNA 5'-Pyrophosphohydrolase (RppH)..... | 29 |
| II.2.13 RNA Ligation..... | 30 |
| II.2.14 cDNA Synthese | 30 |
| 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 |
| II.2.15 RT-qPCR mit Power SYBR® Green und 7500 Fast Applied Biosystems..... | 31 |
| II.2.16 Analyse von Transkriptenden | 32 |
| 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 |
| II.2.17 amiRNA für Kandidatengen Knock-down | 35 |
| II.2.17.1 Erstellung von Artificial miRNAs | 35 |
| II.2.17.2 Amplifikation und Klonierung der erstellten amiRNAs | 36 |
| II.2.18 Transformation von embryogenen Zellkulturgewebe | 38 |
| II.2.18.1 Selektion von transgenen in vitro Pflanzen..... | 38 |
| III Ergebnisse..... | 40 |
| III.1 Feinkartierung der Resistenzloci <i>Ren3</i> und <i>Ren9</i> in experimentellen | |
| Kreuzungspopulationen..... | 40 |
| III.1.1 Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Cabernet Sauvignon' | 41 |
| III.1.2 Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard Blanc' | 46 |
| III.2 Eingrenzung des Resistenzlokus <i>Ren9</i> durch Analyse von rekombinanten F1-Individuen | |
| aus weiteren experimentellen Kreuzungen | 52 |
| III.3 Kandidatengene für Resistenz gegen <i>E. necator</i> aus dem Resistenzlokus <i>Ren3</i>..... | 55 |
| 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 |
| III.4 Funktionelle Analyse von <i>Ren3-1</i> | 72 |
| 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 |
| III.5 Expression von Resistenzassoziierten Genen | 81 |
| 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 |
| IV Diskussion | 93 |
| IV.1 Feinkartierung der Resistenzloci <i>Ren3</i> und <i>Ren9</i> gegen den Echten Mehltau der Weinrebe | |
| in experimentellen Kreuzungspopulationen | 93 |

| | |
|--|--------------|
| 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 |
| IV.2 Identifikation von Resistenzgenanaloga im eingegrenzten QTL-Bereich von <i>Ren3</i> | 101 |
| 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 |
| IV.3 Differentielle Genregulation nach Inokulation mit <i>E. necator</i> | 108 |
| 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 |
| IV.4 Schlussfolgerung und Ausblick | 117 |
| Literatur | XVIII |
| Anhang | XXVI |
| Danksagung | XXXII |