

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungen.....	V
Tabellen .....	XII
Abkürzungen .....	XIV
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>XVI</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XVII</b>
<b>I Einleitung.....</b>	<b>1</b>
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 Resistzenzen.....	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
<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 Tabacco 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 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 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 Expression 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 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>