Sophia Müllner
Institut für Rebenzüchtung in Siebeldingen

Zytologische und molekulare Studien zum Resistenzlocus *Rpv12* gegen den Falschen Mehltau der Rebe (*Plasmopara viticola*)

Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Julius Kühn-Institut
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

Kontakt | Contact:
Sophia Müllner
Julius Kühn-Institut
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Rebenzüchtung
Geilweilerhof 1
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 Schriftenreihe erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB). Einige der Dissertationen erscheinen außerdem online open access und werden unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 Lizenz (CC-BY 4.0) zur Verfügung gestellt (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de). Die Schriftenreihe ist nachgewiesen in unserem Repositorium OpenAgrar:
https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00005667.

The publication series is distributed through the book trade (listed in German Books in Print - VLB). Some of the dissertations are published online open access under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en). The publication series is documented within our repository OpenAgrar: https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00005667.

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 978-3-95547-105-7
ISSN (elektronisch) 2510-0602
ISSN (Druck) 2510-0599
DOI 10.5073/20211105-095339

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

© Der Autor/ Die Autorin 2021.
Dieses Werk wird unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de).

© The Author(s) 2021.
This work is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en).

Zytologische und molekulare Studien zum Resistenzlocus *Rpv12* gegen den Falschen Mehltau der Rebe (*Plasmopara viticola*)

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Sophia Müllner

1. Referentin: apl. Prof. Dr. Eva Zyprian
2. Referent: Prof. Dr. Peter Nick

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 2021

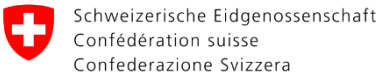
Für meine Eltern Dr. Stefan und Christine Müllner.

Die Durchführung der vorliegenden Arbeit erfolgte am Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof in Siebeldingen und wurde durch das Projekt *Vitifutur* im Rahmen des Interreg V in überregionaler Zusammenarbeit finanziell gefördert. Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des DFG-Projekts Zy11/11-1 AG-Zyprian finanziell unterstützt. Die Sequenzierung eines Genotyps erfolgte in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Genomzentrum Köln der Max-Planck-Gesellschaft (Arbeitsgruppe Dr. Bruno Hüttel) und dem Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) der Universität Bielefeld (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bernd Weisshaar).

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Rahmen einer Research Note unter dem Titel „`Kunbarat´ and `Kunleany´ – full not half-siblings“ in der Fachzeitschrift *Vitis* 2020 veröffentlicht.

Der Oberrhein wächst zusammen, mit jedem Projekt

Europäischer Fonds für regionale Entwicklung (EFRE)



I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis I
II. Abkürzungsverzeichnis V
III. Abbildungsverzeichnis VII
IV. Tabellenverzeichnis IX
V. Zusammenfassung XI
VI. Abstract XIII
1 Einleitung 1
1.1 Die Weinrebe in Europa und Asien 1
1.2 Pathogene der Rebe 2
1.3 Oomyceten 3
1.4 *Plasmopara viticola* 4
1.5 Infektionszyklus von *Plasmopara viticola* 6
1.6 Bisherige Bekämpfungsstrategien von pilzartigen Rebkrankheiten 7
1.7 Resistenzzüchtung 8
1.8 Genetische Ressourcen für Resistenzeigenschaften 9
1.9 Die Amur-Rebe – *Vitis amurensis* 10
1.10 Marker assisted selection - Markergestützte Selektion (MAS) 11
1.11 Das pflanzliche Abwehrsystem 12
1.12 Resistenzproteine 16
1.13 Zielsetzung 17
2 Material und Methoden 18
2.1 Material 18
2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Reaktionskits, Geräte und Software 18
2.1.2 Medien, Lösungen und Puffer 27
2.1.3 Organismen und Nukleotide 30
2.2 Molekularbiologische Methoden 36
2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren 36
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 38

2.2.3 Klonierung von PCR-Fragmenten 43
2.2.4 Pflanzenmaterial 46
2.2.5 *Plasmopara viticola* Sporangienmaterial 47
2.2.6 Vitalitätsfärbung 47
2.2.7 *Plasmopara viticola*-Zoosporen Separierung nach G. Buchholz 47
2.2.8 Blattscheibentest 48
2.3 Mikroskopie 48
2.3.1 Cellulose-Färbung mittels Calcofluor white 48
2.3.2 Myzelfärbung mittels alkalischer Anilinblau-Färbung 49
2.3.3 DNA- und RNA-Färbung mittels Acridin-orange und Ethacridinlactat nach G. Buchholz und M. Müller 49
2.3.4 Färbungen reaktiver Sauerstoffspezies 50
2.3.5 Nitrotetrazolium Blue Chloride 50
2.3.6 Diaminobenzidin 50
2.3.7 Lignin und Suberin-Färbung mittels Auramin O 51
2.3.8 Kallose-Färbung 51
2.3.9 Kallosefärbung mittels Resorcinblau 52
2.3.10 Kallosefärbung mittels Anilinblau 52
2.3.11 Statistische Auswertung des Myzelwachstums unter Nutzung einer Anilinblau-Färbung 52
2.4 DNA-Sequenzierung des Genotyps 2014-099-0003 53
2.4.1 Illumina DNA-Sequenzierung 54
2.4.2 Single Molecule Real Time DNA-Sequenzierung 54
2.4.3 Trio Binning 55
3 Ergebnisse 57
3.1 Abstammungsanalyse von `Kunbarat´ 57
3.2 Mikroskopische Untersuchung des Infektionsverlaufs 58
3.2.1 RNA und DNA-Färbung mittels Acridinorange und Ethacridinlactat 59
3.2.2 Lignin und Suberin-Färbung mittels Auramin O 60

3.2.3 Myzeldokumentation von *Plasmopara viticola* mittels Anilinblau-Färbung 62
3.2.4 Berechnung des Myzelwachstums verschiedener Genotypen.....64
3.2.5 Verstärkung der Resistenz durch Homozygotie von *Rpv12*.....65
3.2.6 Reaktive Sauerstoffspezies in resistenten Genotypen.....68
3.2.7 Kalloseproduktion in resistenten Genotypen 70
3.3 Cleaved Amplified Polymorphic Sequences-Analyse 73
3.4 DNA-Sequenzierung eines *Rpv12*-tragenden Genotyps.....78
3.4.1 Entwicklung neuer molekularer SSR-Marker und Vergleich des Locus *Rpv8* mit *Rpv12* 91
3.5 Der Genotyp DEU098-2006-017 94
4 Diskussion.....101
4.1 Mikroskopische Analysen des Infektionsprozesses durch *Plasmopara viticola* 101
4.1.1 Der *Rpv12*-Locus inhibiert früh das Myzelwachstums von *Plasmopara viticola*.....101
4.1.2 Die Zoosporen erreichen Stomata.....103
4.1.3 Zur Frage der Kalloseakkumulation in *Rpv12*-tragenden Genotypen....104
4.1.4 Keine differentielle Lignin- und Suberinakkumulation in *Rpv12*-tragenden Genotypen 106
4.1.5 Reaktive Sauerstoffspezies in resistenten Genotypen.....107
4.1.6 Myzelwachstum bei *Rpv12*-tragenden Genotypen um die Hälfte reduziert 109
4.1.7 Zusammenfassung mikroskopischer Erkenntnisse.....111
4.2 Genetik und molekulare Untersuchung des *Rpv12*-Locus.....112
4.2.1 Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS)-Marker-Analyse im *Rpv12*-Locus.....112
4.2.2 Vererbung des *Rpv12* Locus und Sequenzierung eines *Rpv12*-tragenden Genotyps 113
4.2.3 Entwicklung neuer SSR-Marker und Vergleich der Loci *Rpv8* und *Rpv12* 117

4.3 Der Genotyp DEU098-2006-017 119
4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick....121
5 Literatur....124
6 Anhang....149
6.1 Makro für Myzelberechnung mittels Fiji. 149
6.1.1 Makro für stärkeres Myzelwachstum 149
6.1.2 Makro für geringes Myzelwachstum 151
6.1.3 Makro zum Zusammenführen verschiedener Excel-Output-Dateien....153
6.2 Abstammungsanalyse von `Kunbarat´ und `Kunleany´ 155
6.3 Datengrundlage zur Myzelberechnung....179
7 Danksagung....184

II. Abkürzungsverzeichnis

BLAST	engl. *Basic Local Alignment Search Tool*
bp	engl. *base pairs*
BUSCO	engl. *Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*
CAPS	engl. *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*
CC	engl. *Coiled-Coil domain*
CDS	engl. *Coding sequence*
CeBiTec	Centrum für Biotechnologie
CED-4	engl. *Caenorhabditis elegans death-4 protein*
CSIRO	engl. *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation*
dpi	engl. *days post inoculation*
engl.	englisch
ETI	engl. *Effector-triggered immunity*
FAM	6-Carboxyfluorescein
flg	Flagellin
franz.	französisch
gDNA	genomische DNA
GF/Gf	Geilweilerhof
GFP	engl. *green fluorescent protein*
$H_2O_{deion.}$	deionisiertes Wasser
HEX	Hexachlorofluorescein
HMMER	engl. *Hidden Markov model*
hpi	engl. *hours post inoculation*
HR	Hypersensitive Reaktion
JKI	Julius Kühn-Institut
LG	engl. *Linkage Group*
LRR	engl. *Leucine-rich repeat*
MAMP	engl. *Microbe-associated molecular pattern*
MAPK	engl. *Mitogen-activated protein kinase*
MAS	engl. *Marker-assisted selection*
NB-ARC	engl. *Nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, R proteins, and CED-4*
NBS	engl. *Nucleotide-binding site*
NCBI	engl. *National Center for Biotechnology Information*
NLR	engl. *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat*
OD	Optische Dichte
OIV	franz. *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*

ORF	engl. *Open Reading Frame*
PAMP	engl. *Pathogen-associated molecular pattern*
PTI	engl. *PAMP-triggered immunity*
QTL	engl. *Quantitative Trait Locus*
Ren	engl. *Resistance to Erysiphe necator*
RGA	Resistenzgen-Analogon
R-Gen	Resistenz-Gen
RLK	engl. *Receptor-like kinase*
RLP	engl. *Receptor-like protein*
RNA-Seq	engl. *High-throughput RNA sequencing*
ROS	engl. *Reactive oxygene species*
ROX	Carboxy-X-Rhodamin
RPS	engl. *Resistance to Pseudomonas syringae protein 3*
Rpv	engl. *Resistance to Plasmopara viticola*
Run	engl. *Resistance to Uncinula necator*
SNP	engl. *Single Nucleotide Polymorphism*
ssp	engl. *Subspecies*
SSR	engl. *Simple Sequence Repeats*
T_A	engl. *Annealing-Temperature*
TAMRA	Carboxy-Tetramethylrhodamin
t_E	Elongationstemperatur
TIR	engl. *Toll/interleukin-1 receptor-like domain*
T_m	Schmelztemperatur
ü. N.	über Nacht
VIVC	engl. *Vitis International Variety Catalogue*

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mit *Plasmopara viticola* infiziertes Blatt. 4
Abbildung 2: Sporangiophore von *Plasmopara viticola* 4
Abbildung 3: Infektionszyklus von *Plasmopara viticola* 7
Abbildung 4: Verteilung identifizierter Resistenzloci 9
Abbildung 5: Anfällige und resistente Rebsorte im Vergleich 14
Abbildung 6: Zickzack-Modell der pflanzlichen Abwehr nach Jones & Dangl, 2006. 15
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Vektors pJet1.2/blunt 33
Abbildung 8: *Single Molecule Real Time* DNA-Sequenzierung 55
Abbildung 9: Klassische Assemblierung, wie sie bei PN40024 12X.v2 angewendet wurde 56
Abbildung 10: Schematische Übersicht der verwendeten Sequenziertechniken 56
Abbildung 11: Stammbaum des Genotyps `Kunbarat´. Genotypen, deren DNA nicht für Prüfungen zur Verfügung stand, wurden grau unterlegt 58
Abbildung 12: Mikroskopische Analyse mittels Acridinorange-Färbung 60
Abbildung 13: Auramin O-Färbung nach 24 hpi 61
Abbildung 14: Alkalische Anilinblau-Färbung von *P. viticola* in Blattgewebe 72 h nach Inokulation 62
Abbildung 15: Alkalische Anilinblau-Färbung von *P. viticola* in Blattgewebe des Genotyps 2014-099-0003 72 h nach Inokulation 63
Abbildung 16: Vergleich des Myzelwachstums verschiedener Resistenzträger nach Korrektur 65
Abbildung 17: Alkalische Anilinblau-Färbung 72 h nach Inokulation 67
Abbildung 18: Vergleich des Myzelwachstums der homozygoten Resistenzträger Hozy01 und Hozy10 68
Abbildung 19: Färbung mit Diaminobenzidin 24 h nach Inokulation 69
Abbildung 20: Färbung mit Nitrotetrazoliumblau-Chlorid 24 h nach Inokulation 70
Abbildung 21: Kallosefärbung mittels Anilinblaufärbung 24 h nach Inokulation mit *Plasmopara viticola* 71
Abbildung 22: Resorcinfärbung zur Detektion von Kallose 24 h nach Inokulation mit *Plasmopara viticola* 72
Abbildung 23: Mikroskopische Aufnahmen von `Kunbarat´-Selbstungslinien acht Tage nach Inokulation 76
Abbildung 24: Stammbaum des Genotyps 2014-099-0003 79

Abbildung 25: Dotplot des maternalen (chr08_p21) Pseudochromosoms 8 des Genotyps 2014-099-0003 gegen Chr08 des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 vor Korrektur 81
Abbildung 26: Dotplot des maternalen Pseudochromosoms 8 des Genotyps 2014-099-0003 gegen das Referenzgenom PN40024 12X.v2 nach Korrektur.....82
Abbildung 27: Grafische Übersicht der Pseudochromosomengrößen des Genotyps 2014-099-0003 aufgetrennt in seine Haplotypen Gf9921 und Gf9918 83
Abbildung 28: BUSCO-Analyse zur Bewertung der Qualität des Assemblies 84
Abbildung 29: Splicing-Vorhersage von Kandidatengenen auf Nukleotid-Ebene des *Rpv12*-Locus 86
Abbildung 30: Alignment der zu erwartenden Protein-Motive der Kandidatengene im *Rpv12*-Locus 86
Abbildung 31: Vergleich der codierten Aminosäuresequenzen der Gene *Gf9918_1422614* und *Gf9918_1422616* mit den Genanaloga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 VCost.v3.....88
Abbildung 32: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Gene *Gf9918_1422618* und *Gf9918_1422619* mit den Genanaloga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 VCost.v3 89
Abbildung 33: Vergleich der Aminosäuresequenz des Gens *Gf9918_1422624* mit den Genanaloga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 VCost.v3 89
Abbildung 34: Vergleich der Aminosäuresequenz des Gens *Gf9918_1422626* mit den Genanaloga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 VCost.v3 90
Abbildung 35: Vergleich der Aminosäuresequenz der LRR-Domäne des Gens *Gf9918_1422614* mit den Genanaloga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 VCost.v3 90
Abbildung 36: Vergleich der Aminosäuresequenz der NB-ARC-Domäne des Gens *Gf9918_1422624* mit den Genanaloga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 VCost.v3 90
Abbildung 37: Der Genotyp DEU098-2006-017 in Parzelle 3 der Liegenschaften des Geilweilerhofs, Siebeldingen 95
Abbildung 38: *V. amurensis* im Vergleich zu *V. rupestris* und *V. riparia* 96
Abbildung 39: Schematische Darstellung eines Blattes des Genotyps DEU098-2006-017 96
Abbildung 40: Ein Vertreter der Art *Vitis rupestris* in Parzelle 3 der Liegenschaften des Geilweilerhofs, Siebeldingen 97
Abbildung 41: Vergleich des Myzelwachstums von DEU098-2006-017 mit *Rpv12*-tragenden und einem anfälligen Genotypen 100

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Chemikalien und Substanzen 18
Tabelle 2: Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien 21
Tabelle 3: Auflistung verwendeter Enzyme 22
Tabelle 4: Auflistung verwendeter Reaktionskits 23
Tabelle 5: Auflistung verwendeter Gerätschaften 23
Tabelle 6: Auflistung verwendeter Software-Produkte. 25
Tabelle 7: Auflistung verwendeter Genotypen 31
Tabelle 8: Oligonukleotide als PCR-Primerpaare 34
Tabelle 9: Standard-Ansatz mit Dream*Taq* DNA-Polymerase 39
Tabelle 10: Reaktionsschema für Reaktionen mit Dream*Taq* Polymerase 39
Tabelle 11: Standard-Ansatz mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase 39
Tabelle 12: Reaktionsschema mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase 40
Tabelle 13: Standard-Ansatz mit der SNP Pol DNA-Polymerase 40
Tabelle 14: Reaktionsschema mit der SNP Pol DNA-Polymerase 41
Tabelle 15: PCR für Simple Sequence Repeats-Längenpolymorphismen zur Marker-Analyse 41
Tabelle 16: Reaktionsschema für Simple Sequence Repeats-Marker-Analyse 42
Tabelle 17: Analytische Restriktion von PCR-Fragmenten 42
Tabelle 18: Standard-Ligationsansatz 44
Tabelle 19: Restriktionsansatz zu Analysezwecken 46
Tabelle 20: Untersuchung der Präsenz von *Rpv3* in den *Rpv12*-homozygoten Genotypen Hozy01 und Hozy10 66
Tabelle 21: Übersicht der möglicherweise Resistenz-assoziierten SNPs im *Rpv12*-Locus 73
Tabelle 22: SSR-Markeranalyse der `Kunbarat´-Inzuchtlinien 74
Tabelle 23: Cleaved Amplified Polymorphic Sequences-Analyse einer `Kunbarat´-Selbstung 77
Tabelle 24: Datenübersicht zur Sequenzierung der Haplotypen Gf9921 und Gf9918. 80
Tabelle 25: Größenvergleich der *Rpv12*-Region zwischen PN40024 12X.v2, Gf9918 und Gf9921 85
Tabelle 26: Äquivalente aus dem Referenzgenom zu NLR-CDS im Haplotyp Gf9918 87
Tabelle 27: Neue Primerpaare zur Nutzung als SSR-Marker für den *Rpv12*-Locus 91
Tabelle 28: Auswahl einiger Marker im *Rpv12*-Locus und ihrer unterschiedlichen Fragmentgrößen bei *Rpv12* und *Rpv8*-Trägern 93

Tabelle 29: Übersicht der Genotypen und Marker die zur Überprüfung möglicher Resistenz-assoziierter Loci auf dem Genotypen DEU098-2006-017 genutzt wurden ..98
Tabelle 30: Markeranalyse des Genotyps DEU098-2006-017 99
Tabelle 31: Verwandtschaft der Rebsorten `Kunbarat´ und `Kunleany´ 155
Tabelle 32: Resistenzloci der Rebsorten `Kunbarat´ und `Kunleany´ 157
Tabelle 33: Abstammung der Rebsorte `Petra´ 158
Tabelle 34: Resistenzloci der Rebsorte `Petra´ 160
Tabelle 35: Abstammung des Genotyps `Sremski Karlovci 77 4-5´ 161
Tabelle 36: Resistenzloci des Genotyps `Sremski Karlovci 77 4-5´ 163
Tabelle 37: Abstammung der Rebsorten `Rani Rizling´ und `Lela´ 163
Tabelle 38: Resistenzloci der Rebsorten `Rani Rizling´ und `Lela´ 166
Tabelle 39: Abstammung des Genotyps `Kozma Csft 2423´ 167
Tabelle 40: Resistenzloci des Genotyps `Kozma Csft 2423´ 168
Tabelle 41: Abstammung der Rebsorte `Mila´ 170
Tabelle 42: Resistenzloci der Rebsorte `Mila´ 172
Tabelle 43: Abstammung der Rebsorte `Zlata´ 173
Tabelle 44: Resistenzloci der Rebsorte `Zlata´ 175
Tabelle 45: Allelgrößen der Referenzsorten `Muscat A Petit Grains´ und `Cabernet Franc´ 176
Tabelle 46: Resistenzloci der Referenzsorten `Muscat A Petit Grains´ und `Cabernet Franc´ 178
Tabelle 47: Original Pixelanzahl die von Myzel bewachsen ist 179
Tabelle 48: Myzelberechnung in Prozent der analysierten Bildfläche 182

V. Zusammenfassung

Plasmopara viticola, das Phytopathogen welches den Falschen Mehltau der Rebe verursacht, kann zu erheblichen Ernteverlusten im Weinbau führen, weshalb zur Vorbeugung eines Befalls große Mengen von Spritzmitteln ausgebracht werden müssen. Um diese Umwelt- und Finanzbelastung zu reduzieren, ist die Identifikation von Resistenz-vermittelnden genomischen Sequenzen essenziell, um die gezielte Züchtung widerstandsfähiger Rebsorten zu verbessern. Bis heute konnten über zwanzig solcher Resistenzloci allein für *P. viticola* identifiziert werden, ihre detaillierte Funktion und das assoziierte Resistenz-vermittelnde Gen wurden bis heute aber nur selten aufgeklärt. Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten konnte die mikroskopische Darstellung der Infektion von *P. viticola* in *Rpv12*-tragenden Genotypen detailliert dokumentiert werden. Hierfür wurden die Genotypen `Afus Ali´ und `Italia´ als anfällige Referenzsorten verwendet, `Kunbarat´ (*Rpv12*, *Rcg1*) und `Kunleany´ (*Rpv12*) als ursprüngliche Rückkreuzungen der *Rpv12*-tragenden *Vitis amurensis*, wurden im Vergleich zu Genotypen die im *Rpv12*-Locus homozygot sind, analysiert. Ergänzend wurden die Genotypen 65-153-18 (*Rpv12*, *Rcg1*), 2004-043-0021 (*Rpv1*/*Run1*, *Rpv3.1*, *Ren3*, *Ren9*) und 2014-099-0003 (*Rpv12*, *Rcg1, Ren3, Ren9*) mitgeführt. Die Verwandtschaft der Genotypen wurde mittels SSR-Marker-Analyse überprüft. Dabei zeigte sich, dass `Kunbarat´, der bisher als Kreuzungsprodukt aus `Italia´ und 28/19 geführt wurde, eigentlich ein Kreuzungsprodukt aus `Afus Ali´ und 28/19 ist und somit Vollgeschwister mit `Kunleany´ ist. Auch konnte eine Fehlannahme in der Nachkommenschaft von `Kunbarat´ geklärt werden. `Petra´ ist Nachkomme von `Savagnin blanc´ und nicht `Pinot Noir´. Mittels unterschiedlicher Färbemethoden für die Mikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der *Rpv12*-vermittelnden Resistenz um eine Post-Penetrations-Resistenz handelt. Diese basiert vor allem auf einer schnellen hypersensitiven Reaktion unter Freisetzung von H_2O_2. Dies zeigt sich durch eine übermäßige Ausprägung von Haustorien von *P. viticola* in resistenten Genotypen aber auch durch eine nahezu vollständige Inhibierung des Myzelwachstums bei Genotypen, die im *Rpv12*-Locus homozygot sind. Eine Kallose- oder anderweitige Zellwandverstärkung auf mikroskopischer Ebene konnte nicht dokumentiert werden. Es konnte jedoch eine Verstärkung der Resistenz durch Homozygotie im *Rpv12*-Locus beobachtet werden. Auch ließ sich ein additiver Effekt bei den homozygoten Genotypen Hozy01 (*Rpv12* homozygot), Hozy10 (*Rpv3.1* und *Rpv12* homozygot) nachweisen. Durch eine Kooperation mit dem *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation* konnten verschiedene CAPS-Marker auf über zweihundert *Rpv12*-

tragenden Genotypen getestet werden, wovon einer als potenziell Resistenz-assoziiert bewertet werden kann.

Im Rahmen einer weiteren Kooperation mit dem Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) der Universität Bielefeld und dem Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Genomzentrum Köln der Max-Planck-Gesellschaft, wurde unter Nutzung von Trio Binning ein nach Haplotypen differenziertes *de novo-Assembly* des Genotyps 2014-099-0003 (*Rpv12*, *Rcg1, Ren3, Ren9*) durchgeführt. Dadurch konnte der *Rpv12*-Locus, der durch Venuti *et al*. (2013) identifiziert wurde, zwischen den SSR-Markern UDV-350 und UDV-370 um etwa 366 kb reduziert werden. Die Anzahl potenzieller Resistenzgene auf Basis von NLR-Motiven wurde dadurch von zwölf (PN40024) auf vier reduziert. Durch RNA-Seq eines nicht-inokulierten Blattes gelang es auf zwei der vier Kandidatengene je zwei Transkripte mit getrennter Teilfunktion der NLRs zu identifizieren, was zur Hypothese des differenziellen Splicings führte.

Auf Grundlage der nun zur Verfügung stehenden Sequenzen wurden neue SSR-Marker zur Identifikation des *Rpv12*-Locus entwickelt. Einen zusätzlichen Aspekt dieser Arbeit stellte die Entdeckung eines neuen möglichen Resistenzlocus-Trägers dar. Eine Kreuzung aus *V. riparia* und *V. rupestris* zeigte sich äußerst widerstandsfähig gegenüber *P. viticola*. Erste mikroskopische und molekularbiologische Studien zum Ausschluss möglicher bekannter Resistenzloci wurden durchgeführt und im Abgleich mit den entsprechenden Locus-assoziierten Referenzsorten keine Übereinstimmungen gefunden.

VI. Abstract

Plasmopara viticola, causing downy mildew in grapevine, is responsible for considerable yield loss in viticulture. The reason why large amounts of fungicides are needed to prevent infestation. To reduce this environmental and financial burden, the identification of resistance-mediating genomic sequences, which enable the targeted breeding of resistant species, is essential. To date, more than twenty resistance loci have been identified against *P. viticola*, but their detailed function and the associated resistance-mediating gene have rarely been elucidated. We documented *P. viticola* infection in *Rpv12*-carrying genotypes in detail by microscopic imaging. For this purpose, the genotypes `Afus Ali´ and `Italia´ were used as susceptible reference cultivars, `Kunbarat´ (*Rpv12*, *Rcg1*) and `Kunleany´ (*Rpv12*) as original backcrosses of *Rpv12*-carrying *Vitis amurensis*, were analysed in comparison to genotypes homozygous in the *Rpv12* locus. We included supplemental genotypes 65-153-18 (*Rpv12*, *Rcg1*), 2004-043-0021 (*Rpv1*/*Run1*, *Rpv3.1*, *Ren3*, *Ren9*), and 2014-099-0003 (*Rpv12*, *Rcg1*, *Ren3*, *Ren9*). We verified the lineage of these genotypes by SSR-Marker analysis. `Kunbarat´ was previously listed as a cross product of `Italia´ and 28/19. However, our analysis showed that it actually is a cross product of `Afus Ali´ and 28/19 and is therefore a full sibling of `Kunleany´. Another misconception in the progeny of `Kunbarat´ could be clarified: `Petra´ is a descendant of `Savagnin blanc´ and not `Pinot Noir´. Using different staining methods for microscopy, we showed that the *Rpv12*-mediated resistance is a post-penetration resistance. Primarily, this is based on a rapid hypersensitive response upon release of H_2O_2. This was confirmed by excessive expression of haustoria of *P. viticola* in resistant genotypes but also by almost complete inhibition of mycelial growth in genotypes homozygous in the *Rpv12* locus. No callose or other cell wall enhancement could be documented as *Rpv12*-related at the microscopic level. We documented an enhancement of resistance by homozygosity in the *Rpv12* locus. Furthermore, we demonstrated an additive effect in the homozygous genotypes Hozy01 (*Rpv12* homozygous), Hozy10 (*Rpv3.1* and *Rpv12* homozygous). As part of a collaboration with the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, we tested various CAPS markers for over two hundred *Rpv12*-carrying genotypes, of which one can be evaluated as putative resistance-associated.

In another collaboration with the Center for Biotechnology (CeBiTec) of Bielefeld University and the Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Genome Center Cologne of the Max Planck Society, a *de novo* assembly of genotype 2014-099-0003 (*Rpv12*, *Rcg1*, *Ren3*, *Ren9*) differentiated by haplotype could be performed using trio binning. This reduced the *Rpv12* locus identified by Venuti *et al.* (2013) between SSR

markers UDV-350 and UDV-370 by approximately 366 kb. As well as the number of potential resistance genes based on NLR motifs was reduced from twelve (PN40024) to four. RNA-Seq of a non-inoculated leaf identified two transcripts each with separate partial function of NLRs on two of the four candidate genes, which lead to the hypothesis of differential splicing. Based on this sequences, new SSR markers were developed to identify the *Rpv12* locus.

An additional aspect of this work was the discovery of a new potential resistance locus carrier. A crossbreed between *V. riparia* and *V. rupestris* proved to be highly resistant to *P. viticola*. Initial microscopic and molecular biological studies to exclude possible known resistance loci showed no matches with the corresponding locus-associated reference cultivars.

1 Einleitung

1.1 Die Weinrebe in Europa und Asien

Die Spuren des Weinbaus reichen weit zurück. Es gibt Nachweise, dass bereits ~5000 v. Chr. im nördlichen Zāgros-Gebirge des Irans Weinanbau betrieben wurde (McGovern *et al.*, 1996; Fatahi *et al*., 2003). Hier wird auch der Ursprung der heute bekannten Edlen Weinrebe *V. vinifera* ssp. *vinifera* vermutet. Dort ging sie aus *V. vinifera* ssp. *sylvestris* hervor. Myles *et al.* zeigten 2011, dass *V. vinifera* ssp. *vinifera*-Populationen genetisch mehr Übereinstimmungen mit östlichen Varianten der *V. vinifera* ssp. *sylvestris* haben als mit westlichen (McGovern, 2003; Myles *et al.*, 2011). Bis heute sind über 60 Wildarten von *Vitis spec.* beschrieben, die aus Nordamerika, Europa und Asien stammen (This *et al.*, 2006).

Bei der Rebe *V. vinifera* ssp. *sylvestris* handelt es sich um eine diözische (zweihäusige) Wildrebenart. Durch anhaltende Selektion entwickelten die Reben größere Beeren und einen höheren Zuckergehalt. Auch erfolgte ein Geschlechtswandel von diözisch zu hermaphroditischen Blüten, womit eine Selbstbestäubung und somit ein höherer Ernteertrag gewährleistet wurde (This *et al.*, 2007, Zou *et al*., 2021). In Mitteleuropa wird der Beginn des Weinreben-Anbaus auf ca. 800 v. Chr. datiert (McGovern, 2003; This *et al.*, 2007). Doch Funde von Samen der Weinrebe lassen vermuten, dass eine Nutzung der Pflanze bereits im Neolithikum (5.800 und 4.000 v. Chr.) sowie der Bronzezeit (2.200 bis 800 v. Chr) stattgefunden hat (Marinval, 1997; This *et al.*, 2006).

Neben der europäischen Wildrebenart *V. vinifera* ssp. *sylvestris* haben sich im nordamerikanischen und asiatischen Raum weitere Wildrebenarten entwickelt. Für den nordamerikanischen Kontinent sind vor allem *V. aestivalis, V. cinerea, V. labrusca, V. riparia, V. rupestris* und *Muscadinia rotundifolia* zu nennen, während im asiatischen Raum die Rebarten *V. amurensis, V. davidii, V. liubanensis*, *V. piasezkii* und *V. romanetii* Bedeutung finden (Wan *et al.*, 2007; Maul *et al.*, 2021). Aufgrund ihrer Kreuzbarkeit mit kultivierten *V. vinifera*-Sorten bieten die Wildrebenarten wichtige genetische Ressourcen (Staudt & Kassemeyer, 1995; Maul *et al*., 2021). Eine Ausnahme bildet jedoch *Muscadinia rotundifolia* da sie über mehr Chromosomen (2n=40) verfügt als andere *Vitis*-Arten (2n=38) (Dermen, 1964; Patil & Patil, 1992).

Die heute im Weinbau am weitesten verbreiteten und in Europa heimischen Reben, gehören zur Art *V. vinifera* und der Unterart Edle Weinrebe (*V. vinifera* ssp. *vinifera*), aber auch Arthybriden zwischen außereuropäischen Rebarten wie *V. amurensis* / *V. labrusca* / *V. rupestris* und *V. vinifera* finden Verwendung im Weinbau. Dies ist vor allem durch Resistenzeigenschaften der nicht-europäischen Arten bedingt. Als anerkannte Rückkreuzungen ist hier die Sorte `Regent´ zu nennen, welche, 1967 gekreuzt, bis 2008 2.200 ha der Weinbaufläche einnahm, und damit zu

den erfolgreichsten Rebsorten mit Resistenzeigenschaften zählt (Töpfer *et al.*, 2011a; Maul *et al*., 2021). Neuere Daten zeigen, dass die Anbaufläche von `Regent´ zwar etwas zurückgegangen ist (1.917 ha), aber diese Rebsorte in Deutschland noch immer zu den am meisten angebauten pilzwiderstandsfähige Rebsorten zählt (DeStatis, 2016).

1.2 Pathogene der Rebe

Die heute häufigsten Pathogene des europäischen Weinbaus, der Rebe *Vitis vinifera*, wurden Mitte des 19. Jahrhunderts, aufgrund des Handels zwischen Frankreich und England mit den USA, von Nordamerika nach Europa eingeschleppt. Der Erreger des Echten Mehltaus, *Erysiphe* (syn. *Uncinula*) *necator* (Schwein. 1834, anamorph *Oidium tuckeri* Berk.), erreichte Europa bereits 1847. *E. necator* wurde zunächst auf Gewächshauspflanzen beschrieben, verursachte aber schon bald bei der anfälligen *V. vinifera* über 80 % bis hin zu 100 % Ernteausfälle (Berkeley, 1847; Wilcox *et al.*, 2015; Zendler Dissertation, 2018). Durch den Import widerstandsfähiger Reben gelangte wenig später, etwa 1863, die Reblaus, *Daktulosphaïra vitifoliae* Fitch, auf das europäische Festland (Ordish, 1972; Powell, 2008). Doch durch Aufpfropfen der *V. vinifera*-Sorten auf amerikanische Wildreben oder Hybriden, welche eine Wurzelreblausresistenz oder –toleranz aufwiesen, konnte der Reblaus Einhalt geboten werden (Weaver, 1976; Jackson, 2008; Hamdan & Basheer-Salimia, 2010).

Allerdings kam es durch die Einfuhr amerikanischer Unterlagsreben auch zum Import des Oomyceten *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis), welcher Falschen Mehltau verursacht (Gessler *et al*., 2011). Seitdem ist dieses Pathogen Ursache erheblicher Ernteverluste. Bereits 1893 dokumentierte Viala in „Les maladies de la vigne“ bei Weinreben einen Ernteverlust von über 75 %. Auch in späteren Jahren, beispielsweise 1915 wurde ein Ernteverlust in Frankreich über 70 % dokumentiert und im Zeitraum von 1907 bis 1916 wurde im badischen Raum in Deutschland eine Ertragsminderung um 33 % durch *P. viticola* festgestellt (Müller, 1938; Cadoret, 1923, 1931; Gessler *et al*., 2011).

Die hohen Ausfälle resultieren daraus, dass *V. vinifera* sich in Abwesenheit dieser Erreger entwickelte und entsprechend keine geeigneten Abwehrmechanismen etablieren konnte.

Eine Publikation von Berkeley aus dem Jahr 1847 lässt allerdings vermuten, dass auch *P. viticola* bereits zusammen mit *E. necator* importiert wurde. Dort heißt es, dass ein verzweigtes Myzel durch die Stomata dringt. Das Wachstum von *P. viticola* erfolgt ausschließlich durch Stomata, während *E. necator* primär auf der Blattoberfläche wächst und dort Appressorien bildet. Auch wird ein vermehrtes Wachstum auf der Blattunterseite beschrieben, was den Eigenheiten von *E. necator* widerspricht (Wilcox *et al.*, 2015; Armijo *et al.*, 2016; Dissertation Zendler, 2018).

Als Auswirkung der Pathogeneinschleppung kommt es in Rebanlagen zu einem hohen Fungizidaufwand. 58 % der Fungizid-Ausbringung in der europäischen Union erfolgt im

Weinanbau, obwohl die für Weinbau genutzte Anbau-Fläche nur 5 % der landwirtschaftlichen Gesamtfläche entspricht (Eurostat, 2007). Dieses Ungleichgewicht verdeutlicht den intensiven Pflanzenschutzmitteleinsatz, welcher einen beträchtlichen Kosten- und Arbeitsfaktor darstellt. Nicht zu vernachlässigen sind dabei auch die Auswirkungen auf die Umwelt, wie beispielsweise der Verbleib von Spritzmitteln im Boden und deren Anreicherung in Gewässern (Komárek *et al.*, 2010). Daher ist die Entwicklung resistenter und widerstandsfähiger Reben, neben weinbaulichen Eigenschaften wie Blühzeitpunkt, Qualität, Ertrag, Wuchsform, immer stärker in den Fokus der modernen Rebenzüchtung gerückt (Töpfer *et al.*, 2011a, 2011b). Auch die Traubenarchitektur spielt bei neueren Kreuzungen eine Rolle, da eine lockere Traubenarchitektur einem unerwünschten Befall durch *Botrytis cinerea* vorbeugen kann (Shavrukov *et al*., 2004; Richter *et al.,* 2020). Der Anbau pilzwiderstandsfähiger Rebsorten führt nicht nur zu einer Reduktion der Spritzmittel-Ausbringung, sondern damit einhergehend auch zu einer erhöhten Dichte von Raub-Insekten, welche Rebenschädlinge wie *Lobesia botrana,* Bekreuzter Traubenwickler, dezimieren (Pennington *et al*., 2018).

1.3 Oomyceten

Taxonomisch wird *P. viticola* der Familie der *Peronosporaceae* innerhalb der Klasse der *Oomyceten* (Eipilze/Algenpilze) zugeordnet. Obwohl Oomyceten durch ihr filamentöses Wachstum ein pilzartiges Erscheinungsbild haben, werden sie taxonomisch den Stramenopiles zugeordnet und sind daher näher mit Kieselalgen verwandt als mit Echten Pilzen (Fungi) (Beakes *et al.*, 2012; Judelson & Ah-Fong, 2019).

Bisher wurden über 1500 Arten beschrieben und darunter auch viele wichtige Phytopathogene. So ging beispielsweise 1845 *Phytophthora infestans*, als Erreger der Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel und die dadurch ausgelöste Hungersnot in Irland, in die Geschichte ein (Stevens, 1933; Ristaino, 2002).

Oomyceten sind sowohl unter aquatischen als auch terrestrischen Bedingungen zu finden. Dort sind sie sowohl als Saprophyten als auch als Parasiten vertreten (Judelson & Ah-Fong, 2019). Wie auch Fungi formen Oomyceten Hyphen aus, welche das Myzel bilden. Doch die Hyphen sind im Gegensatz zu Fungi unseptiert. Während ein wichtiger Baustoff der Fungi-Zellwand Chitin ist, findet sich dieses nur selten in Oomyceten (bspw. in *Plasmopara viticola* und *Medicago truncatula*), stattdessen herrschen hier β-1,3 und 1,6-Glukane, Arachidonsäure und Zellulose vor (Werner *et al.*, 2002; Mélida *et al.*, 2013; Nars *et al.*, 2013; Fawke *et al.*, 2015; Judelson & Ah-Fong, 2019).

Einige Arten der Oomyceten bilden heterokont begeißelte Zoosporen aus, dabei ist eine befiederte Zuggeißel in Schwimmrichtung gerichtet und eine unbefiederte Schleppgeißel richtet

sich rückwärts aus (Santilli, 1958; Dercks & Creasy, 1989). Den Großteil ihres Lebenszyklus verbringen Oomyceten in einem diploiden Zustand, nur während der geschlechtlichen Fortpflanzung bilden sich haploide Zellkerne (Gessler *et al.*, 2011).

1.4 *Plasmopara viticola*

Plasmopara viticola (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni ist der Schaderreger des Falschen Mehltaus bei der Rebe. Ursprünglich auf dem nordamerikanischen Kontinent beheimatet, wurde das Pathogen Ende des neunzehnten Jahrhunderts auf das europäische Festland eingeschleppt. Seitdem gilt *P. viticola*, mit einem Ernteverlust über 75 %, als Erreger einer der gefährlichsten, pilzähnlichen Rebkrankheiten Mitteleuropas (Viala, 1893). *P. viticola* ist ein obligat biotropher, heterothallischer Oomycet (Wong *et al*., 2001; Fiore-Donno & Bonkowski, 2021). Das heißt, dass *P. viticola* auf lebendes, pflanzliches Gewebe angewiesen ist und die Verbreitung über einen vegetativen und einen sexuellen Fortpflanzungszyklus (vgl. Abbildung 3) erfolgt (Burruano, 2000). *P. viticola* stammt von einem *Phytophthora*-ähnlichen Pathogen ab, das sich auf Grund des Verlusts von Genen, die am Stickstoffmetabolismus und dem γ-Aminobuttersäure-Katabolismus beteiligt sind, auf eine biotrophe Lebensweise umstellte (Brilli *et al*., 2018).

Durch die Spaltöffnungen, Stomata, des grünen Pflanzengewebes (junge Triebe, Blätter, Gescheine und junge Beeren), gelangt der Organismus mittels Zoosporen in den Wirt. Dabei

Abbildung 1: Mit *Plasmopara viticola* infiziertes Blatt. `Traminer´ aus dem Freiland. Zu sehen ist die Blattunterseite, und die daraus wachsenden Sporangiophoren.

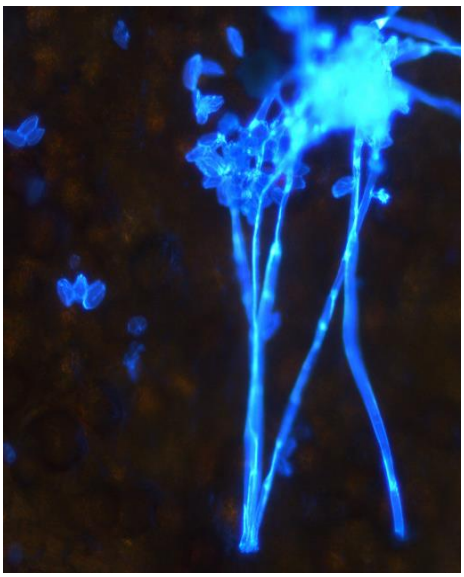


Abbildung 2: Sporangiophore von *Plasmopara viticola*. Zu sehen sind Sporangiophoren, die mit Calcofluor White gefärbt wurden.

befällt *P. viticola* alle grünen Teile des Rebstockes, welche über Stomata infiziert werden können. Erste Symptome des Befalls sind die sogenannten Ölflecken. Dies sind chlorotische Läsionen,

verursacht durch Chlorophyllabbau aufgrund des Nährstoffentzugs. Bei feucht-warmen Temperaturen entsteht auf der Blattunterseite ein mehlartiger Belag, bei dem es sich um die asexuellen Fortpflanzungsorgane, die Sporangiophoren, *P. viticolas* handelt (Abbildung 1, Abbildung 2). Mit fortschreitender Erkrankung werden die befallenen Stellen nekrotisch. Starker Befall kann zu einer vollständigen Entlaubung der Wirtspflanze führen. Woraus eine Verringerung der Kohlenhydratproduktion hervorgeht, welche Einfluss auf die Pflanzenvitalität und Traubenqualität haben kann (Goidanich, 1983; Jermini *et al.*, 2010). Bei einem Befall der Gescheine, vor oder während der Blüte, kommt es, durch Eintrocknen der Beeren, zur Entwicklung sogenannter „Lederbeeren“ und somit zu einem totalen Ernteverlust. Spätere Infektionen haben jedoch nur wenig Einfluss auf den Ertrag (Kennelly *et al*., 2005; Carisse, 2016). Als heterothallischer Organismus weist *P. viticola* einen asexuellen und einen sexuellen Infektionszyklus auf. Bisherige Theorien zur sexuellen Fortpflanzung besagen, dass im Herbst geschlechtlich gebildete Oosporen mit dem Falllaub in den Boden gelangen, wo sie mehrere Jahre überdauern können (Burruano, 2000). 2019 publizierten Fröbel & Zyprian jedoch, dass Myzel nahezu ubiquitär in der Rebe zu finden und auch die sexuelle Reproduktion über das Jahr hinweg nachweisbar ist. Dabei kann *P. viticola* mit einem speziellen fächerartigen Myzelwachstum auch Blattadern überqueren und in das Holz gelangen. Dies lässt vermuten, dass die Überwinterung auch in Knospen und Holz stattfindet. Treffen zwei heterothallische Hyphen aufeinander, kommt es zur sexuellen Reproduktion, durch welche winterharte Oosporen gebildet werden. Dies konnte 2001 durch Wong *et al.* nachgewiesen werden, welche verschiedene Einzelspor-Isolate miteinander kombinierten (Wong *et al.*, 2001). Die Heterothallie des Oomyceten ermöglicht eine hohe genetische Diversität und eine damit verbundene Anpassungsfähigkeit an mögliche Abwehrmechanismen des Wirts. Eine besonders hohe Diversität konnte in Zentraleuropa dokumentiert werden, was nach dem Import des Pathogens auf ein stufenweises Migrationsmodell hindeutet (Gobbin *et al.*, 2006). Basierend auf der Anpassungsfähigkeit des Pathogens ist eine auf Resistenz ausgerichtete Rebenzüchtung, mit der Kombination mehrerer Resistenzloci, der sogenannten Pyramidisierung, essenziell für einen zukunftsgerichteten Weinbau (Eibach *et al.*, 2007).

1.5 Infektionszyklus von *Plasmopara viticola*

Ab 11 °C beginnen die Oosporen zu keimen, dabei bilden sie Primärsporangien aus (Kennelly *et al.*, 2007). Bei Kontakt mit Wasser werden von den Primärsporangien nach etwa 90 min Zoosporen freigesetzt, welche sich mit Hilfe ihrer zwei Geißeln gezielt fortbewegen können. Pro Sporangie können vier bis sechs Zoosporen schlüpfen. Innerhalb von nur fünf Minuten finden die Zoosporen die Stomata, enzystieren an deren Rand und bilden einen Keimschlauch, mit dem sie in das Parenchym des Blatts eindringen (Kiefer *et al.*, 2002). Wie genau die Zoospore die Stomata findet, ist bis heute nicht geklärt. Es wird diskutiert, ob bspw. chemische Stoffe oder elektrische Felder vom Blatt abgegeben werden, an welchen sich die Zoospore orientiert oder ob die Oberflächenstruktur des Wirtes zur Bildung eines Keimschlauches führt (Morris *et al.*, 1992; Morris & Gow, 1993; Cahill & Hardham, 1994). Akaberi beschrieb 2016 in ihrer Dissertation, dass Zoosporen unter Einfluss exogener Quellen von Farnesen, einem Terpen, im Finden der Stomata gehemmt waren. 60 % der Zoosporen fanden zwar Stomata, der Rest formte jedoch abseits Keimschläuche oder wurde an Blattadern gefunden. Schröder hingegen zeigte 2010 in seiner Dissertation, dass Rebsorten, welche niedrigere Konzentrationen des Aldehyds Nonanal, absondern, als andere Reben, weniger anfällig für eine Infektion von *P. viticola* sind.

Bei Erreichen einer pflanzlichen Zellwand bildet der Infektionsschlauch ein Appressorium aus, womit er die Zellwand durchdringt, mittels Haustorien entzieht er dem Wirt Nährstoffe. Daraufhin breitet sich *P. viticola* mit der Ausbildung weiterer Hyphen im Interzellularraum aus (Kortekamp *et al.*, 1998). Bei perfekten Bedingungen, also hoher Luftfeuchtigkeit (über 90 %) bei 14-28 °C, kann nach etwa fünf Tagen die Ausbildung erster Sporangiophoren beobachtet werden (Burruano, 2000). Die Sporangiophoren wachsen aus den Stomata heraus und bilden baumartige Strukturen, an deren Enden sich die asexuellen Sporangien befinden (Kortekamp *et al.*, 1998). Aus den asexuellen Sporangien werden wieder Zoosporen freigesetzt und der Infektionszyklus startet erneut (vgl. Abbildung 3).

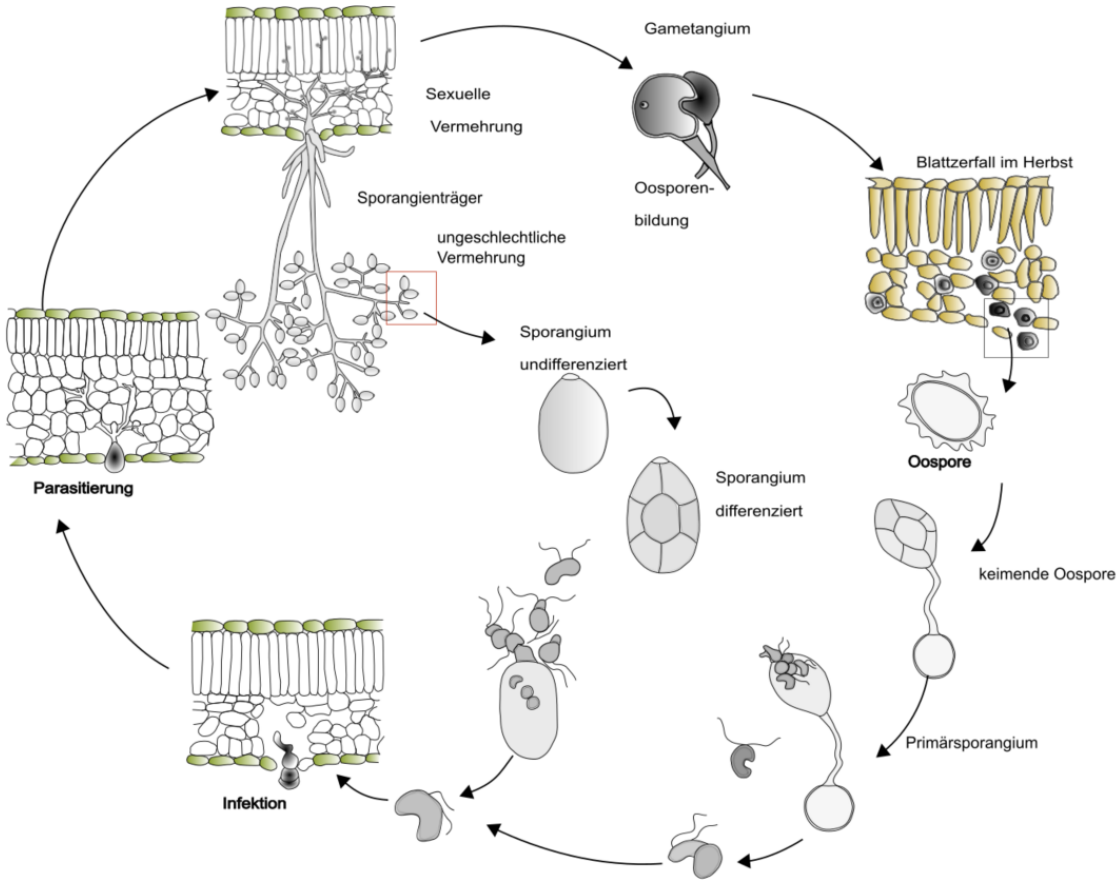


Abbildung 3: Infektionszyklus von *Plasmopara viticola*. Der äußere Kreis beschreibt die sexuelle Reproduktion, während der innere Kreis die asexuelle Vermehrung darstellt (verändert nach Schöpe, 2000).

1.6 Bisherige Bekämpfungsstrategien von pilzartigen Rebkrankheiten

Nach Einfuhr und Aufkommen der Rebkrankheit Falscher Mehltau, fiel recht schnell die Fungizidwirkung von Kupferverbindungen (Vitriol und Kalkmilch) auf. Französische Winzer verwendeten diese ursprünglich, um Traubendiebstähle durch Passanten zu vermeiden, da die Kupferverbindung den Reben eine bläuliche Farbe und einen unangenehmen Geschmack verlieh. Doch dabei zeigte sich, dass damit behandelte Reben keine Symptome des Falschen Mehltaus aufwiesen (Millardet, 1885a & 1885b; Delas, 2002). Kupferverbindungen haben bis heute im Kampf gegen *P. viticola* und andere Pflanzenkrankheiten nicht an Bedeutung verloren, sie finden vor allem noch im ökologischen Anbau Verwendung. Diese Verwendung ist allerdings kritisch zu betrachten, da Kupfer sich im Boden anreichert. Um mögliche Umweltschäden gering zu halten, wurde bereits 2002 durch die Europäische Union eine Begrenzung der Kupfer-Verwendung festgeschrieben (Commission Regulation(EC) 473/2002; Komárek *et al*., 2008; La Torre *et al.*, 2018). Im konventionellen deutschen Weinbau sind derzeit neun Wirkstoffgruppen (Azetamide, Carbonsäure Amide (engl. *Carboxylic acid amide,* CAA), Benazamide, Pyrimidylamine, Phenylamide, Benzamide, Sulfonamide, Acylpicolide, Piperidinyl-thiazol-isoxazolin) in Gebrauch (Staatliches Weinbauinstitut Freiburg, 2021). Um Resistenzen zu

vermeiden, ist ein regelmäßiger Wechsel zwischen den Wirkstoffgruppen essenziell. In Brasilien konnten beispielsweise multiple Resistenzen gegen die CAA-Wirkstoffgruppe nachgewiesen werden (Santos *et al*., 2020). Die Fungizidausbringung kann durch computergestützte Prognosemodelle unterstützt werden. Beispielweise werden anhand von Wetterdaten die wichtigsten Zeitpunkte im Zyklus von *P. viticola* ermittelt und auf der Internetseite http://www.vitimeteo.de veröffentlicht. Dadurch wird dem Winzer ein Anhaltspunkt zum besten Spritzzeitpunkt gegeben (Bleyer *et al*., 2008). Durch die Anpassung der Spritztermine an das Wetter, lässt sich der Fungizidverbrauch verringern und der Ernteertrag verstärken. Eine weitere Reduktionsmöglichkeit bietet der Anbau widerstandsfähiger Rebsorten.

1.7 Resistenzzüchtung

Bei der modernen Rebenzüchtung stehen neben einer hohen Weinqualität auch einige andere Eigenschaften im Fokus. Im Hinblick auf die fortschreitende Klimaveränderung ist beispielsweise eine gute Anpassung an veränderte klimatische Bedingungen relevant (Töpfer *et al.*, 2011a; Alikadic *et al*., 2019). Kürzere Wachstumsperioden sind, auf Basis einer Simulationsstudie, zu erwarten (Alikadic *et al*., 2019). Aber auch die Identifikation und Analyse von Resistenzeigenschaften nimmt einen hohen Stellenwert ein, da mit dem sich verändernden Klima auch die Befallsstärke durch Mehltau-Erreger zunehmen könnte und die Rebe gegebenenfalls geschwächt wird. Da *V. vinifera* ssp. *vinifera* hoch anfällig für Mehltauerreger ist, werden vorwiegend Resistenzmerkmale aus Wildarten analysiert, welche durch interspezifische- und folgende Rückkreuzungen in den Genpool der qualitätsbetonten Kulturformen gelangten (Welter *et al*., 2007; Schwander *et al*., 2012; Di Gaspero *et a*l., 2012; Venuti *et al*., 2013). Der Grundstein für die europäische Resistenzzüchtung wurde bereits 1878 durch Millardet gelegt, welcher empfahl, die Qualität der *V. vinifera* ssp. *vinifera* mit den Resistenzeigenschaften amerikanischer Reben zu kombinieren (Töpfer *et al.*, 2011a). Di Gaspero *et al.* beschrieben 2012 basierend auf Hedrick (1908) und Pinney (1989), dass die Resistenzzüchtung sogar noch weiter zurückreicht. Die Rebsorten `Isabella´ (1816) und `Catawba´ (1819) sind Kreuzungen zwischen *V. labrusca* und *V. vinifera*. Die Rebsorte `Norton´, die auf eine Kreuzung aus *V. aestivalis* und *V. vinifera* zurückgeht, wurde ab 1830 verkauft (Di Gaspero *et al*., 2012).

Einige der bisher identifizierten Resistenzloci sind in Abbildung 4 basierend auf dem Referenzgenom PN40024 vermerkt (Jaillon *et al.*, 2007; Canaguier *et al.*, 2017; Maul *et al.*, 2021).

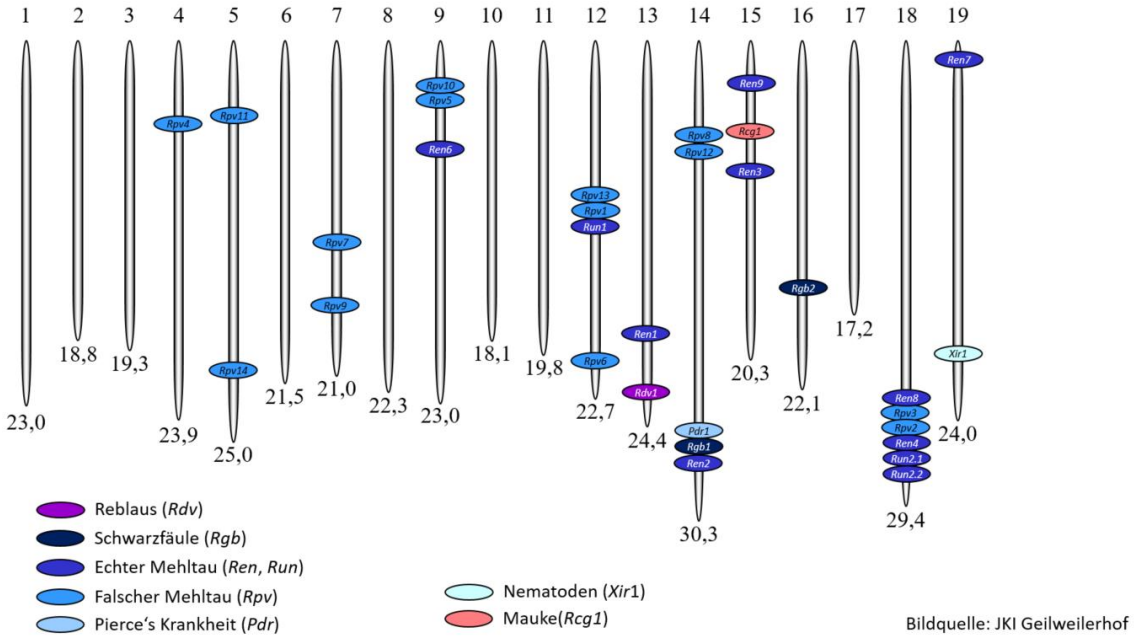


Abbildung 4: Verteilung identifizierter Resistenzloci. Gezeigt sind hier die 19 Chromosomen der Weinrebe, ihre Chromosomengröße [Mb] und einige identifizierte Resistenz-Loci. Die Abbildung entstammt dem Institut für Rebenzüchtung, Julius Kühn-Institut, Geilweilerhof.

1.8 Genetische Ressourcen für Resistenzeigenschaften

Schon bald nach Einschleppung der Mehltau-Erreger *P. viticola* und *E. necator* zeigte sich, dass amerikanische Wildreben Resistenzeigenschaften gegenüber diesen Krankheitserregern besitzen, welche Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts durch interspezifisches Kreuzen mit *V. vinifera*-Sorten in den europäischen Genpool einflossen (Koleda, 1975; Staudt & Kassemeyer, 1995; Di Gaspero & Cipriani, 2003; Töpfer *et al.*, 2011a).

Allerdings brachten die Wildreben nicht nur die Resistenzeigenschaften mit, sondern auch negative Geschmacksnoten, sogenannte Fuchs-Töne (Anthranilsäuremethylester), ungünstige Wuchsformen und andere unerwünschte Eigenschaften (Alleweldt & Possingham, 1988; Di Gaspero *et al.*, 2012). Dies machte wiederholte Rückkreuzungen erforderlich, um die störenden Eigenschaften aus dem Zuchtmaterial zu entfernen. Die ersten gezielten Resistenzzüchtungen werden auch als amerikanische bzw. französische Hybriden bezeichnet. Obwohl sie über gute Resistenzeigeschaften verfügten, waren sie wegen der schlechten Weinqualität unbeliebt (Töpfer *et al.*, 2011a). Diese Hybriden dienten später als Ausgangsmaterial für Rückkreuzungen und brachten erste pilzwiderstandsfähige, sogenannte „Piwi“ -Sorten mit guten Geschmackseigenschaften hervor. Die bekanntesten Vertreter sind wohl unter anderem `Johanniter´, `Phoenix´ und `Regent´. Doch nicht nur amerikanische Wildreben haben sich durch Resistenzeigenschaften hervorgetan, auch bei asiatischen Wildreben konnten entsprechende Eigenschaften beobachtet und identifiziert werden (Koleda, 1975; Schwander *et al.*, 2012; Venuti

et al., 2013). Dabei ist bis heute nicht geklärt, warum asiatische Wildreben Abwehrmechanismen gegenüber *P. viticola* vorweisen, obwohl *P. viticola* in Asien nicht vertreten ist. Es wird eine Co-Evolution mit in Asien auftretenden verwandten *Plasmopara*-Arten oder Pathogenen mit *P. viticola* ähnlichen Effektoren vermutet (Protsenko, 1946; Jürges *et al.*, 2009; Schröder *et al.*, 2011). Eine asiatische Wildart der Rebe, von welcher schon mehrere Resistenzloci identifiziert wurden, ist *V. amurensis* (Wan *et al.*, 2007; Schwander *et al.*, 2012; Blasi *et al.*, 2011; Venuti *et al.*, 2013).

1.9 Die Amur-Rebe – *Vitis amurensis*

Die Amur-Rebe (*V. amurensis*) ist im fernen Osten (vor allem Nordost-China) beheimatet (Wan *et al.*, 2008). Sie ist an Temperaturen bis -45 °C angepasst und einige Populationen zeigen sich als unempfindlich für einen Befall durch *P. viticola* (Koleda, 1975). Aufgrund dieser Eigenschaften ist die Amur-Rebe seit einer Expedition des russischen Botanikers Vavilov (1920-1940) interessant für Rebenzüchter (Loskutov, 1999; Venuti *et al*., 2013). Einige Formen der domestizierten Rebe werden im Nordosten Chinas angebaut und zeichnen sich durch relativ große Beeren und hermaphroditische Blüten aus (Wang *et al.*, 2004; Wan *et al.*, 2008; Blasi *et al.*, 2011; Venuti *et al*., 2013). Erst 1960 wurden Exemplare von *V. amurensis* mit *V. vinifera* gekreuzt, weshalb bis dahin im europäischen Raum vor allem Eigenschaften nordamerikanischer Reben für züchterische Zwecke verwendet wurden (Koleda, 1975; Venuti *et al*., 2013). Viele Züchtungen, die von den amerikanischen bzw. französischen Hybriden abstammen, verfügen über den Resistenzlocus *Rpv3*, welcher bereits seit Mitte des neunzehnten Jahrhunderts eingekreuzt wird (Welter *et al*., 2007; Di Gaspero *et al.*, 2012). Der Resistenzlocus *Rpv10* hingegen geht auf *V. amurensis* zurück und konnte 2012 beschrieben werden (Schwander *et al.*, 2012). Einige resistente Rebsorten wie `Sibera´ (Deutschland), `Golubok´ (Ukraine), `Rondo´ (Deutschland) und `Solaris´ (Deutschland), tragen den *Rpv10*-Locus (Dissertation Fröbel, 2019; Maul *et al.*, 2021). Aber es konnte beobachtet werden, dass einige andere Kreuzungsprodukte von *V. amurensis* existieren, die zwar eine starke Resistenz gegenüber *P. viticola* besitzen, bei welchen jedoch kein *Rpv10* nachgewiesen werden konnte (Schwander *et al.*, 2012, Venuti *et al*., 2013). Venuti *et al.* zeigten 2013, dass es einen weiteren Resistenzlocus gibt, welcher durch *V. amurensis* vererbt wurde. Dieser Locus wurde *Rpv12* genannt.

Der *Rpv12*$^{+}$-Haplotyp ist in 15 SNP-Varianten (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) differenziert. Die ältesten Träger bilden dabei die Sorten `Zarya Severa´ (1936, Russland) und `Michurinets´ (UdSSR). Weitere *Rpv12*-Träger stellen `Kunbarat´ und `Kunleany´ dar, deren Kreuzung 1960 in Ungarn stattfand. Die damalige Züchtung erfolgte nach phänotypischer Auswahl (Venuti *et al.*, 2013).

Der *Rpv12*-Phänotyp zeigt innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach der Inokulation (engl. *hours post infection*, hpi) eine hypersensitive Reaktion und unterdrückt damit eine Sporulation von *P. viticola*. Wenngleich die Art und Geschwindigkeit der Abwehr dem Phänotyp von *Rpv3*-Trägern ähneln, ist die Abwehr durch *Rpv12*-Träger signifikanter. Zudem konnte die Abwehr bei *Rpv12*-Trägern auch bei *P. viticola*-Stämmen gezeigt werden, die die Abwehr von *Rpv3*-Trägern umgehen können. Eine Kombination von *Rpv3* und *Rpv12* führte zu einer Unterbindung der Sporulation (Venuti *et al.*, 2013). Selbst *P. viticola*-Isolate, die auf *Rpv3.1* und/oder *Rpv3.2*-Trägern Sporangiophoren bildeten, konnten sich auch sechs Tage nach Inokulation auf *Rpv12*-Trägern nicht behaupten (Dissertation Eisenmann, 2019).

Der Locus *Rpv12* wurde mittels QTL-Analyse (engl. *Quantitative trait loci*) auf einen Bereich zwischen den genetischen Markern UDV-350 und UDV-370 (äußerste Begrenzung) UDV-345 und UDV-360 (engste Eingrenzung) eingegrenzt (Venuti *et al.*, 2013).

1.10 Marker assisted selection - Markergestützte Selektion (MAS)

Da die Rebe als diploider Organismus zwei Chromosomensätze besitzt, in ihren Genorten meist heterozygot ist und Selbstungen aufgrund der schnell auftretenden Inzucht-Depression kaum möglich sind, sind genetische Analysen der Rebe sehr schwierig (Mullins *et al*., 1992; Töpfer *et al.*, 2011a). Weiterhin spielt auch die späte Merkmalsausprägung eine wichtige Rolle. Reben tragen erst nach über drei Jahren Früchte, sodass die Rebenzüchtung ein zeit- und kostenintensives Unterfangen ist. Die Weinqualität kann sogar erst nach fünf bis acht Jahren evaluiert werden (Töpfer *et al.*, 2011b). Daher ist die Analyse von Reben auf genetischer Ebene essenziell, um die raumfordernden Züchtungsprogramme effizient zu gestalten. Hierfür stellt die Markergestützte Selektion (engl. *Marker assisted selection*, MAS) eine ideale Lösung dar. Genetische Marker nutzen DNA-Fragmente, die eine hohe Diversität der Fragmentlänge zwischen verschiedenen Rebsorten aufweisen. Sogenannte einfache Wiederholungen (engl. *simple sequence repeats*, SSR), also kurze Basenabfolgen die sich wiederholen, bspw. ATTATTATTATT. Je nach Rebsorte sind diese Wiederholungen länger oder kürzer und ihre Längen können mittels fluoreszierender Marker sehr genau bestimmt werden. Da die DNA in allen Pflanzenzellen zur Verfügung steht, ist eine solche genetische Analyse unabhängig vom Entwicklungsstadium oder dem Gesundheitszustand der zu testenden Pflanze (Sefc *et al.*, 2009).

Mittels QTL-Analyse, also der Verrechnung von physiologischen Merkmalen mit genetischen Marker-Informationen, können bestimmten Merkmalen definierte Markerdaten (Allellängen) zugeordnet werden. Dadurch können bereits Sämlinge auf das Vorhandensein bestimmter Merkmale untersucht werden. Damit einhergehend ist nun auch die Möglichkeit der Pyramidisierung zu verfolgen. Dabei werden verschiedene Resistenz-Loci mittels MAS-Züchtung miteinander kombiniert, um verschiedenen Erkrankungen und Resistenzbildungen vorzubeugen

(Eibach *et al.*, 2007). Dies war vor Einführung der MAS nur bedingt möglich, da bei der physiologischen Untersuchung der Pflanzen und visuellen Bonitur nur nach „resistent ja oder nein“ ausgewählt werden konnte.

Resistenz und Klimaanpassung sind bei der Rebe als Dauerkultur besonders wichtig. Die Rebe verbleibt meist zwischen 30 und 50 Jahren im Weinberg und ist dort vielen biotischen und abiotischen Einflüssen ausgesetzt (DeStatis, 2016).

Da Pathogene, wie *P. viticola*, aufgrund ihrer Heterothallie ein enorm hohes Anpassungpotential haben, ist es nicht verwunderlich, dass Rückkreuzungen der französischen Hybriden bereits anfällig für einige Varianten von *P. viticola* sind. Rebsorten wie `Johanniter´ oder `Regent´ haben *P. viticola* nur *Rpv3.1* entgegenzusetzen (McDonald & Linde, 2002; Peressotti *et al.*, 2010; Eisenmann *et al.*, 2019).

Bei der Identifikation und Pyramidisierung von Resistenzloci dürfen nicht nur die Mehltau-Erkrankungen im Fokus stehen. Auch andere Rebpathogene, die derzeit noch durch Fungizidanwendungen kontrolliert werden, wie *Botrytis cinerea*, *Guignardia bidwellii* (Anamorph: *Phyllosticta ampelicida* (Engleman) van der Aa), *Elsinoe ampelina, Pseudopezicula tracheiphila* (Syn. *Pseudopeziza tracheiphila* Müll.-Thurg.) oder *Phomopsis viticola*, könnten in Zukunft an Bedeutung gewinnen. Vor allem dann, wenn der Fungizidverbrauch durch Anbau Mehltau-widerstandsfähiger Neuzüchtungen reduziert werden kann (Rousseau *et al*., 2013; Pedneault & Provost, 2016).

1.11 Das pflanzliche Abwehrsystem

Im Laufe der Evolution haben Pflanzen eine Vielzahl an Mechanismen entwickelt, um sich gegen Phytopathogene zu wehren (Dangl & Jones, 2001). Diese Mechanismen werden in präformierte und induzierte Resistenz differenziert (Ferreira *et al.*, 2006).
Unter der präformierten Resistenz versteht man primär unterschiedliche mechanische Hürden, präformierte Barrieren, zur Abwehr von Pathogenen. Dazu zählen beispielsweise ausgeprägte, hydrophobe Wachsschichten oder verstärkte Zellwände (Dixon, 2001; Heath, 2000; Kamoun, 2001; Nürnberger *et al*., 2004; Nürnberger & Lipka, 2005). Auch Trichome, die eine dichte Blattbehaarung bilden, konnten als effektive Infektionsbarriere gegen Herbivoren und Phytopathogene wie *P. viticola* identifiziert werden (Kortekamp & Zyprian, 1999; Handley *et al*., 2005). Zudem wird ein Einfluss der Stomata-Formation auf die Penetration durch *P. viticola* diskutiert. Bei resistenten Akzessionen von *V. amurensis*, *V. californica*, *V. riparia* und *V. rupestris* sowie einigen *V. sylvestris*-Akzessionen konnte bspw. an den Schließzellen der Stomata eine zusätzliche innere kutikuläre Kante nachgewiesen werden (Jürges *et al.*, 2009). Weiterhin können chemische Barrieren eine Infektion unterbinden. Pflanzen verfügen über

verschiedene Phytoanticipine, welche dauerhaft in gesunden Pflanzen präsent sind. Im Gegensatz dazu stehen induzierte Antimykotika, Phytoalexine, welche erst bei Infektion synthetisiert werden. Phytoanticipine lagern sie bspw. in Organellen der äußeren Zellschicht oder Vakuolen ein (Van Etten *et al.,* 1994; Osbourn *et al.*, 1994; Osbourn, 1996; Melton *et al.*, 1998; Morrisey & Osbourn, 1999).
Sollten die beschriebenen morphologischen Vorkehrungen der Pflanze nicht ausreichen und ein Pathogen die Blattoberfläche erreichen, so kommt es zur induzierten Resistenz.
Bei *V. vinifera* zeigen die meisten morphologischen Abwehrmechanismen gegenüber *P. viticola* zumeist keine Wirkung, sie ist anfällig. Dem Pathogen gelingt es, an den Stomata der Pflanze zu enzystieren, mit einem Keimschlauch in die substomatale Höhle zu dringen, interzellulär zu wachsen und Sporen zu produzieren (Kiefer *et al*., 2002). Die Anfälligkeit der Pflanze gegenüber einem Pathogen stellt jedoch die Ausnahme dar, da Pflanzen prinzipiell über eine sogenannte Nicht-Wirts-Resistenz verfügen, also eine Erkennung von unspezifischen Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (engl. *pathogen-associated molecular pattern*, PAMPs) (Heath, 2000). Der Nicht-Wirts-Resistenz steht die Wirts-Resistenz gegenüber, durch welche Pathogene anhand von Resistenzgenen (R-Genen) identifiziert und ihre Bekämpfung initiiert wird (Jones & Takemoto, 2004).

Für die Abwehr eines Pathogens ist zunächst dessen Detektion grundlegend. Dies geschieht durch RLK-Oberflächenrezeptoren (engl. *Receptor like kinases*), die sich auf der Plasmamembran pflanzlicher Zellen befinden. Diese Rezeptoren binden an spezielle, meist konservierte Pathogen-Strukturen, die PAMPs (Monaghan & Zipfel, 2012; Irieda *et al.*, 2019). Zu den PAMPs, oft auch als Induktoren bezeichnet, gehören beispielsweise bakterielle Lipopolysaccharide, Flagelline sowie Chitin, Ergosterol und β-Glucan von Oomyceten und Pilzen (Yu *et al*., 2017). Werden PAMPs erkannt, kommt es zur Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden, welche die Produktion verschiedener Stoffe einleiten, die PAMP induzierte Immunität (PTI, engl. *PAMP triggered immunity*). In vielen Fällen spielen dabei Transkriptionsfaktoren wie bspw. WRKYs (benannt nach der Aminosäuresequenz WRKYGQK), MYB (engl. *Myeloblastosis*) und ERF (engl. *Ethylene responsive factors*), die die schnelle Expression von PR-Genen (engl. *Pathogenesis related*) induzieren, eine tragende Rolle (Merz *et al.*, 2015). *AtWRKY52* verfügt beispielsweise über TIR–NBS–LRR-Motive (engl. *Toll/interleukin-1-receptor–nucleotide-binding site-leucine-rich repeat*) welche mit *RPS4* (Resistenz *Pseudomonas syringae*) interagiert und eine Resistenz gegen den Pilz *Colletotrichum higginsianum* sowie das bakterielle Pathogen *Pseudomonas syringae* stützt (Narusaka *et al.*, 2009, Phukan *et al*., 2016). Unter anderem wird die MAPK-Signalkaskade induziert (Mitogen aktivierte Protein Kinase) und es erfolgt ein Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration im Zytoplasma. Weiterhin werden Phytoalexine, Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffspezies (engl. *Reactive oxigen species*, ROS) produziert sowie die Zellwand der Pflanzenzellen durch

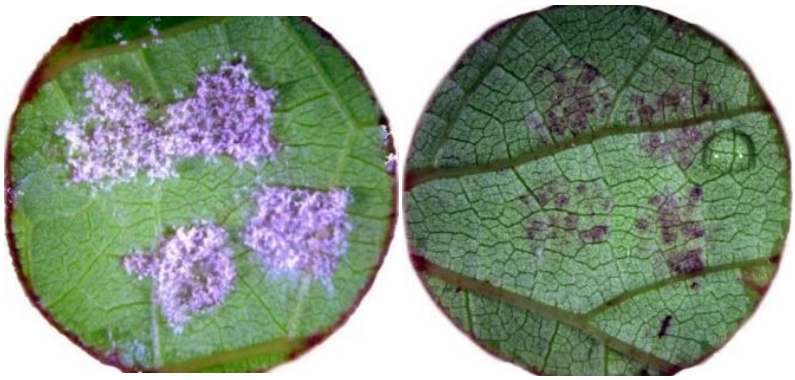


Abbildung 5: Anfällige und resistente Rebsorte im Vergleich. Gezeigt sind hier zwei Blattscheiben, links die anfällige Sorte `Müller Thurgau´ und rechts die *Rpv12*-tragende Rebsorte `Kunleany´, 13 Tage nach Inokulation mit dem Erreger des Falschen Mehltaus der Rebe, *Plasmopara viticola*. Gut zu sehen ist der mehlartige Belag auf `Müller Thurgau´, bei dem es sich um Sporangiophoren handelt, während `Kunleany´ braune Läsionen, die Hypersensitive Reaktion (HR), zeigt (Müllner, 2019).

Apposition verstärkt. Dabei werden beispielsweise Kallose, phenolische Verbindungen oder Lignin gebildet (Flors *et al.*, 2005; Bhuiyan *et al.*, 2009). Beginnt die Pflanze mit der gezielten Produktion von ROS werden diese in Form von Hydroxyl-Radikalen (•OH), Superoxid-Radikalen ($O_2^{\bullet -}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) freigesetzt (Bolwell & Wojtaszek, 1997; Mittler *et al.*, 1999; Govrin & Levine, 2000). Dabei gilt H_2O_2 als das stabilste Molekül (Costet *et al.*, 2002; Shetty *et al.*, 2007). Neben diesen lokalen Resistenzmechanismen treten auch systemische Reaktionen in Form der Produktion niedermolekularer Signalsubstanzen auf. Dazu zählen unter anderem Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen (Glazebrook, 2005, Yu *et al*., 2017).

Allerdings führt die Produktion und Freisetzung von ROS zum Absterben der Zellen, sodass Nekrosen entstehen. Diese Form der Apoptose bezeichnet man als hypersensitive Reaktion (engl. *hypersensitive response,* HR). Die HR dient bei obligat biotrophen Organismen dazu, dem Pathogen die Nahrungsgrundlage zu entziehen (vgl. Abbildung 5, Govrin & Levine, 2000). Es gibt Pathogene, die von der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies profitieren, beispielsweise *Botrytis cinerea* (Govrin & Levine, 2000). Andere Pathogene, wie *Zymoseptoria tritici*, verfügen über eine Vielzahl an Chloroperoxidasen, mit welchen sie reaktive Sauerstoffspezies detoxifizieren (Bengtson *et al*., 2013; Palma-Guerrero *et al*., 2017). Da Pflanze und Pathogen in einem evolutionären Wettrüsten stehen, haben Pathogene Wege entwickelt, die PAMP-induzierte Immunität zu inhibieren.

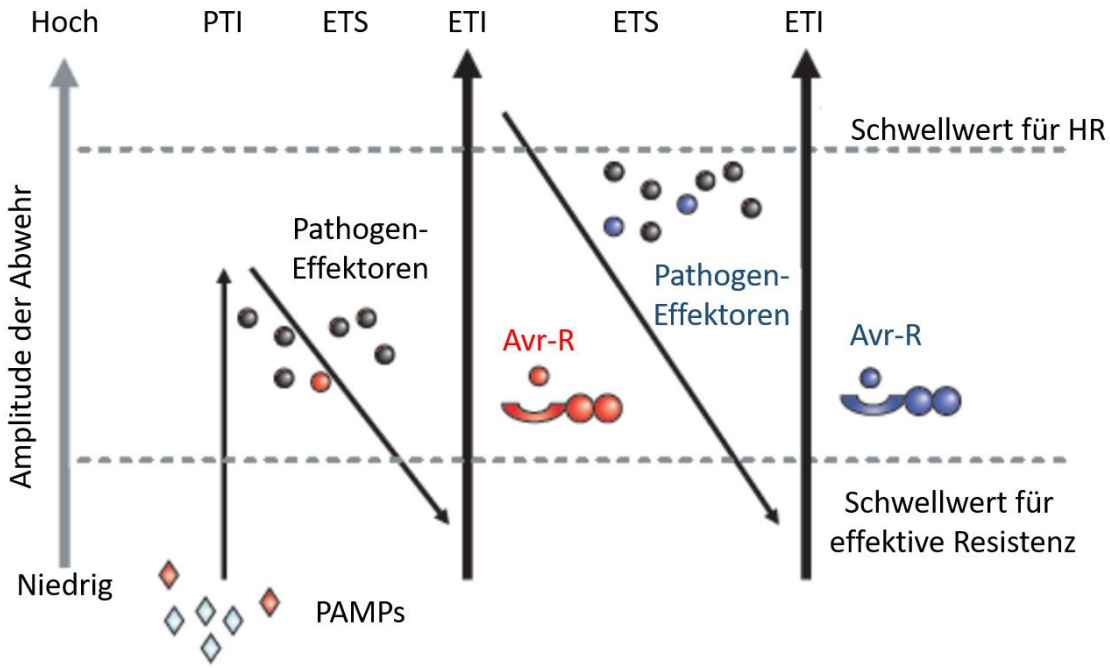


Abbildung 6: Zickzack-Modell der pflanzlichen Abwehr nach Jones & Dangl, 2006. Dieses Schema zeigt den Wechsel zwischen Pathogen- und Pflanzenreaktion. Die Pfeile stehen jeweils für verschiedene Phasen der Immunreaktion. In Phase 1 erkennt die Pflanze mittels Mustererkennungs-Rezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PPR) Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), dargestellt als rote Rauten. Eine PAMP induzierte Immunität (engl. *PAMP triggered immunity*, PTI) wird ausgelöst. Die Krankheitserreger versuchen mittels Effektoren (schwarze Kugeln) die Erkennung zu inhibieren. Dadurch kommt es zur Effektor-ausgelösten Anfälligkeit (engl. *Effector triggered susceptibility*, ETS). Ein Effektor (rote Kugel) wird von einem NLR-Protein erkannt und löst eine Effektor-induzierte Immunität (engl. *Effector triggered immunity*, ETI) aus. Dabei handelt es sich um eine verstärkte Version der PTI. Die hypersensitive Reaktion (engl. *hypersensitive response*, HR) wird ausgelöst und es kommt zu einem Absterben der betroffenen Zellen. In der letzten Phase werden Pathogenisolate ausgewählt, die den Effektor (rote Kugel) verloren haben und durch horizontalen Genfluss (blaue Kugeln) möglicherweise neue Effektoren erhalten haben, welche wiederum die ETI unterdrücken können (Jones & Dangl, 2006).

Dies geschieht durch die Abgabe von Virulenz-Faktoren durch die Pathogene (Effektoren), die zu einer allosterischen Hemmung der PAMP-Komponenten führen (Jones & Dangl, 2006).

Die Pflanze hingegen entwickelte Resistenz-Proteine (R-Proteine), welche die Effektoren detektieren und binden. Durch die Synthese eines R-Proteins wird die Effektor-induzierte-Immunität (engl. *Effector-triggered Immunity*, ETI) eingeleitet. Bei Fehlen des passenden R-Proteins kann das Wachstum des Pathogens nicht gehemmt werden und die Pflanze ist anfällig. Beispielsweise konnte im Jahr 2000 gezeigt werden, dass die *FLS2*-Erkennung von flg22 Resistenzmechanismen induziert, wodurch das Bakterienwachstum inhibiert wird. Doch Pflanzen, denen *FLS2* fehlt, zeigten sich anfällig (Gómez-Gómez & Boller, 2000; Chisholm *et al*., 2006). Eine Schematische Darstellung der Pflanzen-Pathogen-Interaktion ist in Abbildung 6 gezeigt.

In den letzten Jahrzehnten rückten auch kleine nichtcodierende RNAs, sogenannten sncRNAs (engl. *small non coding* RNAs) weiter in den Fokus der Pathogenabwehr-Untersuchungen.

miRNAs (engl. *micro*) und siRNAs (engl. *small interfering RNAs*) konnte eine Rolle in der Immunantwort von Pflanzen nachgewiesen werden (Katiyar-Agarwal & Jin, 2010; Padmanabhan *et al.*, 2009; Fei *et al.*, 2016). Sie spielen wichtige Rollen in der Transkription und posttranskriptionellen Regulation (Brodersen & Voinnet, 2006; Fei *et al.*, 2016). Die miRNA interagieren mit den kodierenden Bereichen für NBS-LRR-Motive (engl. *Nucleotide binding site – leucine rich repeats*), was zur Produktion von phasiRNAs (engl. *phased, secondary small interfering RNAs*) führt, welche für regulatorische Effekte verantwortlich sein können (Fei *et al.*, 2016). 2018 konnte durch Brilli *et al.* bestätigt werden, dass endogene microRNAs (*miRNAs*) in der Pflanzenentwicklung eine Rolle spielen.

1.12 Resistenzproteine

Resistenzgene (R-Gene) kodieren Resistenzproteine (R-Proteine), die für die Identifikation von Krankheitserregern relevant sind. Sie induzieren eine Abwehrreaktion durch die Aktivierung von Signalkaskaden und werden in fünf Klassen differenziert: *LRR-TM-* (engl. *Leucine-Rich Repeat plus Transmembrane Receptor*), *RLK-* (engl. *Receptor-Like Kinase*), *SA-CC-* (engl. *Signal Anchor plus Coiled-Coil*) Gene und *NLR*-Gene (engl. *nucleotide-binding side leucine-rich repeat*). Die größte und vielfältigste Klasse bilden dabei die NLR-Proteine (Dangl & Jones, 2001; Hulbert *et al*., 2001; Wei *et al*., 2020). Die Nukleotid-Bindestelle (NBS) ist Teil einer größeren Domäne, der NB-ARC-Domäne (engl. *Nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, R proteins, and CED-4)* welche Homologien zu Zelltodeffektoren bei Tierzellen aufweist. Sie ist essenziell für die Bindung von ATP oder GTP (Van der Biezen & Jones, 1998). Bei den LRRs handelt es sich um eine variable Anzahl von Leucin-reichen Sequenzen am C-Terminus (Martin *et al*., 2003; Takken *et al*., 2006). Da sie Interaktionen zwischen Proteinen ermöglichen, sind sie für die spezifische Identifikation der Effektoren zuständig (Takken *et al*., 2006).

NLRs können anhand ihrer N-terminalen Domäne in CC-NLRs (engl. *coiled-coil*) und TIR-NLRs (engl. *toll/interleukine-1*) differenziert werden (Pan *et al*., 2000; Takken *et al*., 2006). Beide Typen der NLRs sind in der Weinrebe vertreten. 2008 konnte bspw. durch Kortekamp *et al.* gezeigt werden, dass es nach einer *P. viticola*-Infektion der resistenten Wildart *V. riparia* `Gloire de Montpellier´ zu einer spezifischen Expression von *VRP1* kommt. Dabei handelt es sich um ein *CC-NLR*-Gen. Im *Rpv1*-Locus von *Muscadinia rotundifolia* befindet sich hingegen ein *TIR-NLR*-Gen, welches Resistenz-assoziiert ist und 2016 durch Williams *et al*. auf seine Kristallstruktur hin untersucht wurde. Auch im *Rpv10*-Locus konnten *NLR*s als potenzielle *R*-Gene identifiziert werden (Fröbel Dissertation, 2019).

1.13 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die mikroskopische, molekularbiologische und bioinformatische Analyse des Resistenzlocus *Rpv12*, welcher 2013 von Venuti *et al.* beschrieben wurde. Dafür sollten Blattscheibentests an verschiedenen Resistenzträgern durchgeführt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels verschiedener Färbemethoden die Entwicklung des Myzels überprüft werden. Weiterhin sollte der Resistenzlocus *Rpv12* soweit möglich, mittels merkmalsgekoppelter, molekularer Marker weiter eingegrenzt werden und der Stammbaum der *Rpv12*-Träger `Kunbarat´ und `Kunleany´ überprüft werden, um diese Eingrenzung zu stützen. Im Weiteren sollte ein möglicher Dosis-Effekt bei *Rpv12*, durch die mikroskopische Analyse im *Rpv12* Locus homozygoter Genotypen, überprüft werden.
Insgesamt wurden Analysen von über 150 Genotypen durchgeführt. Für detaillierte Untersuchungen wurden zehn ausgewählt und auf diese fokussiert: `Afus Ali´ (anfällig), `Italia´ (anfällig), `Kunbarat´ (*Rpv12*, *Rcg1*), `Kunleany´ (*Rpv12*), Hozy01 (homozygot *Rpv12*), Hozy10 (homozygot *Rpv3.1* und homozygot *Rpv12*), 65-153-18 (*Rpv12*, *Rcg1*), 2004-043-0021 (*Rpv1*, *Rpv3.1*, *Run1*, *Ren3*, *Ren9*), 2014-099-0003 (*Rcg1*, *Rpv12*, *Ren3*, *Ren9*) und VAR-017 (ungeklärt).

Weiterhin sollte die Sequenz des *Rpv12*-Locus im Genotyp 2014-099-0003 in Kooperation mit dem Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) der Universität Bielefeld (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bern Weisshaar) und dem Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Genomzentrum Köln der Max-Planck-Gesellschaft (Arbeitsgruppe Dr. Bruno Hüttel) mittels Illumina-DNA-Sequenzierung der parentalen Genotypen (65-153-18 und 2004-043-0021) und SMRT-DNA-Sequenzierung des Kreuzungsprodukts (2014-099-0003) sowie Phasen-getrennter Sequenzassemblierung ermittelt und mit bioinformatischen Gen-Vorhersagetools auf potenzielle Kandidatengene (RGA) des *Rpv12*-Locus untersucht werden. Diese sollten dann zum Referenzgenom PN40024 12X.v2 in Kontrast gesetzt werden. Aus diesen Analysen sollte die Entwicklung weiterer molekularer Marker für die Züchtung ermöglicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Reaktionskits, Geräte und Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Chemikalien (Tabelle 1), Verbrauchsmaterial (Tabelle 2), Enzyme (Tabelle 3) und Reaktionskits (Tabelle 4) verwendet, welche in den nachfolgenden Tabellen mit Herstellerangaben aufgelistet sind. Weiterhin sind die verwendeten Gerätschaften und Software-Produkte in Tabelle 5 und Tabelle 6 dokumentiert.

H_2O

Für die experimentellen Arbeiten wurde Wasser in vier verschiedenen Reinheitsstufen verwendet. Im Folgenden wird unter $H_2O_{Leitung}$ unbehandeltes Leitungswasser verstanden, während H_2O_{deion} deionisiertes Wasser und H_2O_{bidest} doppelt aufgereinigtes Wasser beschreibt.
Dabei wird für die Gewinnung von H_2O_{bidest} H_2O_{deion} in eine Seralpur Pro 90CN-Anlage geleitet und dieses mittels Ionenaustauschertechnologie von jeglichen anorganischen Salzen und Verunreinigungen befreit.
Für Arbeiten mit SSR-Markern wurde Wasser im Chromatographie-Reinheitsgrad (Liquid Chromatography LiChrosolv®, Merck KGaA, Darmstadt) verwendet, im Weiteren als $H_2O_{LiChrosolv}$ beschrieben. Die Lösungen, Medien und Puffer wurden mit H_2O_{deion} angesetzt.

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Chemikalien und Substanzen. Aufgeführt sind hier im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Substanzen sowie deren Hersteller.

Chemikalien und Substanzen

Acridin Orange	Merck KGaA, Darmstadt
Agar	Gustav Essig GmbH & Co. KG, Mannheim
Agar Bacteriology grade	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Agarose	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern
Ampicillin	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Ammoniak (25 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Anilinblau	Merck KGaA, Darmstadt

Bacto™ Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Beltanol	Probelte S.A.U., Murcia, Spanien
Bromphenol Blau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
$CaCl_2$	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Calcofluor white Lösung (CalcofluorWhite M2R 1 g/l, Evans blue 0,5 g/l)	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Diaminobenzidin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Essigsäure	VWR International GmbH, Randor, PA, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethacridinlactat	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol, absolute	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Ficoll-400	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
GeneRuler™ LR	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Glukose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glyzerin	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Hawita Traysubstrat + Perlite-Erde	Hawita Gruppe GmbH, Vechta
HCl, p.a. (≥37 %)	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Jiffy-7®	Jiffy Products International BV, Zwijndrecht, Niederlande
K_2HPO_4 x 3 H_2O	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mangan(II)-chlorid ($MnCl_2$)	Merck KGaA, Darmstadt
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natronlauge (NaOH)	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
p-Nitrotetrazoliumblauchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Orange G	Merck KGaA, Darmstadt
Propan-2-ol	VWR International GmbH, Randor, PA, USA
Resorcinol	Merck KGaA, Darmstadt
Rhododendronerde	Hawita Gruppe GmbH, Vechta
Serva DNA Stain G	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypanblau	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Tabelle 2: Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien. Aufgeführt sind hier im Rahmen dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller.

Verbrauchsmaterial

0,2 ml Reaktionsgefäß, steril	Eppendorf AG, Hamburg
1,5 ml Reaktionsgefäß, steril	Eppendorf AG, Hamburg
2,0 ml Reaktionsgefäß, steril	Eppendorf AG, Hamburg
5,0 ml Reaktionsgefäß, steril	Eppendorf AG, Hamburg
15 ml Reaktionsgefäß, steril	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
50 ml Reaktionsgefäß, steril	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
12-Well-Platte	SPL Life Sciences, Naechon-myeon Pocheon-si, KR-41, Korea
96-Well-Platte	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
384-Well-Platte	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Aquarium-Filterwatte	Dehner Holding GmbH & Co. KG, Rain
Deckgläschen	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Bielefeld
Exsikkator	Glaswerk, Wertheim
Mörser und Pistill	Jipo, Jizerská porcelánka s.r.o, Dessendorf, Tschechien
Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Petrischalen	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen, 10 µl	VWR International GmbH, Randor, PA, USA
Pipettenspitzen, 100 µl	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen mit Filter 200 µl	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen, 1000 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA & Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitze 5 ml	Gilson, Middleton, WI, USA

quadratische Untersuchungs-Schalen Corning 431111 243 mm x 245 mm aus Polysteren	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Rasierklingen	Plano GmbH, Wetzlar
Tüpfelplatte	Haldenwanger W. Technische Keramik GmbH & Co. KG, Waldkraiburg
Wasserstrahlpumpe	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Zählkammer (Neubauer, Tiefe 0,100 nm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen

Tabelle 3: Auflistung verwendeter Enzyme. Aufgeführt sind hier im Rahmen dieser Arbeit verwendete Enzyme sowie deren Hersteller.

Enzyme

Dream*Taq* DNA-Polymerase mit Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Genaxxon SNP Pol Polymerase mit Puffer	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm
KAPA2G Fast Multiplex Mix	Merck KGaA, Darmstadt
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase mit Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Restriktionsendonukleasen mit Puffern	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA & New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RNase	Qiagen GmbH, Hilden
T4-DNA-Ligase mit Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Reaktionskits. Aufgeführt sind hier im Rahmen dieser Arbeit verwendete Reaktionskits sowie deren Hersteller.

Reaktionskits

GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NucleoSpin® 96 Plant II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Nucleospin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
peqGOLD Plant DNA Mini Kit	VWR International GmbH, Randor, PA, USA

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Gerätschaften. Aufgeführt sind hier die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte sowie deren Hersteller.

Autoklav

Tisch-Autoklav Systec DX-23	Systec & Services GmbH, Karlsruhe

Aufschluss von Blattmaterial

Paintshaker, SK450	Fast & Fluid Management BV, Sassenheim, Niederlande

Bildgebende Geräte

Fluoreszenzmikroskop DM4000B	Leica Camera AG, Wetzlar
Kamera Canon EOS 750D	Canon, Ōta, Tokio, Japan
Lichtquelle KL1500 electronic	Schott AG, Mainz
Stereomikroskop Axio Zoom.V16	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Stereomikroskop Leica M205FA 1x – 160x	Leica Camera AG, Wetzlar

Fragment-Analyse

ABI 3130xl Genetic Analyser	Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
EC330 Midi Cell Electrophoretic Gel System	E-C Apparatus Corporation, Holbrook, NY, USA
EC360 Maxi Cell Electrophoretic Gel System	E-C Apparatus Corporation, Holbrook, NY, USA

Power Supply EC105	E-C Apparatus Corporation, Holbrook, NY, USA
QUANTUM ST5 mit UV-Leuchttisch	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell

Inkubation

Brutschrank B20	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Klimaschrank SE 41 PGC Percival	CLF PlantClimatics GmbH, Wertingen
Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Schüttelinkubator 3031	LAUDA-GFL mbH, Burgwedel
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg

Gefriertrocknungsanlage

Lyo Cube 4-8 Gefriertrocknung	Martin Christ, Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz

PCR

ABI 9700 Thermocycler	Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mastercycler® personal	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler® gradient	Eppendorf AG, Hamburg
7500 Fast DX Real Time PCR	Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

pH-Meter

Consort C680	Consort bvba, Turnhout, Belgien

Photometer

CLARIOstar®-Photometer	BMG Labtech GmbH, Ortenberg

Probenmischer

IKA RCT B (Magnetrührer)	IKA Labortechnik, Staufen
Vortex Genie 2™	Scientific Industries, Bohamia, NY USA

Sterilbank

Safe 2020 Class II Bio. Safety Cabinet	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Waagen

Feinwaage ABJ-NM/ABS-N	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Waage PB3015	Sartorius AG, Göttingen

Zentrifugen

MikroliterZentrifuge Z160M	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen
Tischzentrifuge 6 16KS	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Tischzentrifuge 2K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

Tabelle 6: Auflistung verwendeter Software-Produkte. Aufgeführt sind hier die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Software-Produkte sowie deren Hersteller.

PCR-Fragment Analyse

GeneMapper 5	Applied Biosystems, Darmstadt
VisionCapt	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell

Photometer

CLARIOstar Reader Control	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
MARS Data analysis	BMG Labtech GmbH, Ortenberg

Bioinformatik und Datenbanken

BLAST	engl. *Basic local alignment search too* *https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi l* Altschul *et al*., 1990 Altschul *et al*., 1997
BUSCO	engl. *Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs* https://busco.ezlab.org/ Simão *et al.*, 2015 Waterhouse *et al.*, 2018
CLC Main Workbench 7.7.3	Qiagen Bioinformatics Redwood City CA, USA
FGeneSH	Softberry Mount Kisco, NY, USA Solovyev *et al.*, 2006 http://www.softberry.com
Fiji (ImageJ-win64)	Schindelin *et al*., 2012
GBVitis	JKI/DV S.Kecke, G.Marx, A.Ganesh v6.4
Gramene	www.gramene.org Cold Spring Harbor Laboratory, Oregon State University, EMBL-EBI
HMMER	engl. *Hidden Markov Model* HmmerWeb version 2.41.1 *http://hmmer.org/* *https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan* *Eddy, 2011*
ML Relate	Kalinowski *et al.,* 2006
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	NCBI Bethesda MD, USA www.ncbi.nlm.nih.gov
Primer3Plus 2.4.0	https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi Untergasser *et al.*, 2012
R & R-Studio	Version 4.0.3 https://www.R-project.org/ R Core Team, 2020
Swiss Institute of Bioinformatics SIB MyHits Motif Scan	https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan Pagni *et al.*, 2007

Tm Calculator	Thermo Fisher Scientific Inc. https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator
Vitis International Variety Catalogue (*VIVC*)	www.vivc.de Maul *et al.,* 2021

2.1.2 Medien, Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders angegeben, wurden Lösungen mit H_2O_{deion} angesetzt.
Die Medien wurden bei 121 °C und 1,1 bar Überdruck 20 min autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 2 % w/v granulierter Agar Bacteriology grade (PanReac AppliChem ITW Reagents Darmstadt) hinzugegeben.

Anilinblau-Lösung für Myzelfärbungen

Anilinblau	0,05	%
K_2HPO_4	0,067	M

Anilinblau-Lösung für Kallosefärbungen

Anilinblau	0,01	%
K_2HPO_4 (pH 9,5)	150	mM

Der pH-Wert wurde mit KOH und H_3PO_4 eingestellt.

Bleichlösung

Ethanol	600	ml
Essigsäure	200	ml
Glyzerin	200	ml

FSB-Puffer (engl. *frozen storage buffer,* pH 6,4, steril filtriert)

KCl	100	mM
$MnCl_2$ x 4 H_2O	45	mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	10	mM
Hexamin $CoCl_3$	3	mM
Glyzerin	10	% (w/v)
K-Acetat (pH 7,5)	10	mM

Der pH-Wert wurde mit KOH und HCl eingestellt.

LB - Medium (engl. *lysogeny broth*, pH 7,4)

Bacto™ Trypton	10,0	g
Bacto™ Yeast Extract	5,0	g
NaCl	5,0	g
H_2O_{deion}	ad 1,0	l

Für Agarplatten: Bacto Agar 2 %

Ladepuffer 6x

Ficoll-400	7,5	mg
Tris-HCl pH 8,0 (500 mM)	2	ml
EDTA pH 8,0 (500 mM)	6	ml
SDS 10 %	2,25	ml
Orange G	15	mg
Bromphenol Blau	8	mg
H_2O_{bidest}	Ad 100	ml

Natrium-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,5)

NaH_2PO_4 (1M)	8	ml
Na_2HPO_4	42	ml
H_2O	Ad 1	l

TAE-Puffer (50 x); pH 8,3

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	2	M
Essigsäure	1	M
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	50	mM
H_2O_{bidest}	Ad 1	l

TBII-Puffer (engl. *transformation buffer*, pH 6,8, steril filtriert)

MOPS (pH 6,8)	10	mM
KCl	10	mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	15	mM
Glyzerin	15	% (w/v)

Der pH-Wert wurde mit NaOH und HCl eingestellt.

TE-Puffer (10 x); pH 8,0

Tris	1,21	g
EDTA	0,37	g
H_2O_{bidest}	ad 100	ml

Der pH-Wert wurde mit HCl und NaOH eingestellt.

2.1.3 Organismen und Nukleotide

2.1.3.1 Bakterien

Stamm: *E. coli* K12 Stamm DH5α

Genotyp: F^- φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(r_K^-, m_K^+) *pho*A *sup*E44 λ^- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1

Der *E. coli*-Stamm DH5α eignet sich durch ***lacZΔM15*** unter Nutzung von 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) für blau/weiß-Selektion, verfügt über eine hohe Insert-Stabilität *(rec*A1) und erbringt eine hohe Plasmidausbeute sowie eine hohe DNA-Qualität durch die *end*A-Mutation. Angaben über den Bakterienstamm wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen.

2.1.3.2 *Plasmopara viticola*

Plasmopara viticola wurde für Inokulationsversuche aus dem Freiland von verschiedenen anfälligen Rebsorten genommen. Teilweise wurde das Material auf Blättern der Rebsorten `Müller Thurgau´, `Italia´, `Gutedel´, `Afus Ali´ oder `Kozma Csft 2423´ propagiert.

2.1.3.3 Rebsorten und Genotypen

Im Verlauf dieser Arbeit wurden viele verschiedene Genotypen der Rebe für molekularbiologische und mikrobiologische Untersuchungen verwendet, welche in Tabelle 7 dargestellt sind. Pflanzen, die im Gewächshaus kultiviert und für Blattscheibentests verwendet wurden, sind durch Fettschrift hervorgehoben.

Tabelle 7: Auflistung verwendeter Genotypen. Aufgeführt sind die Zuchtstamm- bzw. Sortenbezeichnungen, die Elterpflanzen und dokumentierte Resistenzloci. Die Zeichen entsprechen folgenden Zuständen: +/+ bedeutet der Resistenzlocus ist heterozygot vorhanden; +/- bedeutet der Resistenzlocus ist rekombiniert, links positiver Marker, rechts negativ; -/+ bedeutet der Resistenzlocus ist rekombiniert, rechts positiver Marker, links negativ; +/++ bedeutet ein Allel mit beidseitig positiven Markern, das andere Allel rekombiniert. Also: links: heterozygot, rechts: homozygot. ++/+ bedeutet ein Allel ist mit Markern beidseitig positiv, das andere Allel rekombiniert. Also: links: homozygot, rechts: heterozygot; ++/++ bedeutet, der Resistenzlocus ist homozygot vorhanden. Die aufgeführten Daten wurden teilweise durch Dr. Oliver Trapp zur Verfügung gestellt.

Zuchtstamm	**Elter 1**	**Elter 2**	*Rpv1/ Run1*	*Ren3*	*Ren9*	*Rpv3.1*	*Rpv10*	*Rpv12*	*Rcg1*
2004-043-0021	-	-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
2012-203-0001	Zala Gyoengye	O.P.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	++/++	-/-
2012-203-0010	Zala Gyoengye	O.P.	-/-	-/-	-/-	++/++	-/-	++/++	-/-
2014-099-0003	2004-043-0021	65-153-18	-	+/+	+/+	-/-		+/+	+/+
65-153-18	A - 4/15	Lemberger	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
Afus Ali	unbekannt	unbekannt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Irsai Oliver	Pozsonyi	Csaba Gyoengye	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
IRZ0973	-	-							
Italia	Bicane x Muscat Hamburg	Bicane x Muscat Hamburg	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Kozma Csft 2423	Kunbarat	Pannonia Kincse x Seyve Villard 5276	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+
Kunbarat	28/19	Afus Ali	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
Kunleany	28/19	Afus Ali	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-
Lela	Kunbarat	Welschriesling	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-
Lemberger	Zimmettraube blau	Heunisch weiß	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Mila	Kunleany	Muscat Ottonel	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-
Muscat Ottonel	Chasselas Blanc	Ingram's Muscat	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Petra	Kunbarat	Savagnin blanc	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-
Pinot Noir	Savagnin blanc	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Rani Rizling	Kunbarat	Welschriesling	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+
Savagnin blanc	-	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Zuchtstamm	**Elter 1**	**Elter 2**	*Rpv1/ Run1*	*Ren3*	*Ren9*	*Rpv3.1*	*Rpv10*	*Rpv12*	*Rcg1*
Sremski Karlovci 77 4-5	Kunbarat	Savagnin blanc	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-
VAR-017	-	-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
***V. amurensis* Colmar**	-	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
Welschriesling	-	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Zala Gyoengye	Villard Blanc	Csaba Gyoengye	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-
Zlata	Kunleany	Irsai Oliver	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-

2.1.3.4 Plasmide

pJet1.2/blunt

Der Vektor pJet1.2/blunt (Abbildung 7, Thermo Fisher Scientific) enthält ein für das Bakterium *E. coli* letales Restriktionsenzymgen *Eco47IR*, welches durch Insertion eines DNA-Fragmentes unterbrochen wird. Die Restriktionsendonuklease *Eco47IR* verursacht im aktiven Zustand eine Restriktion des *E. coli*-Genoms, sodass es zum Absterben des Bakteriums kommt. Daraus resultierend wachsen nur Bakterienzellen, welche rekombinante Plasmide enthalten. Durch das *AmpR* β-Lactamase-Gen wird eine Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt.

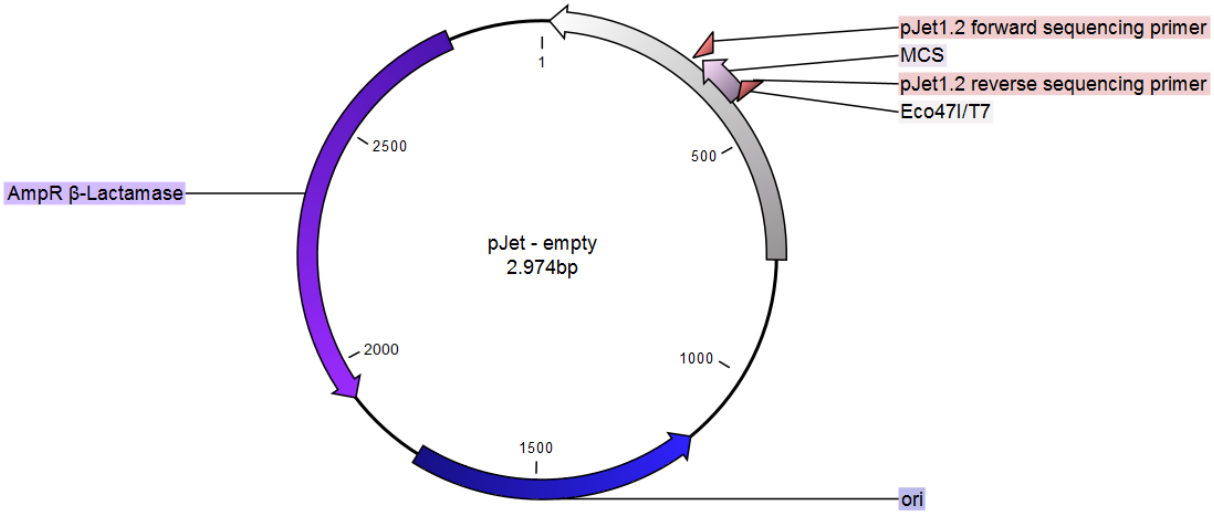


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Vektors pJet1.2/blunt. Der Replikationsursprung (ori) ist blau eingezeichnet. Das *AmpR* β-Lactamase-Gen ist violett markiert, während die mutierte Version der *Eco471R* Restriktions-Endonuklease grau dargestellt ist. Weiterhin sind die Multiple cloning site (MCS) in rosa und die Sequenzier-Primer (pJet1.2 forward/reverse sequencing primer) in rot dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm CLC erstellt. Die Sequenz und ihre Annotationen wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen.

2.1.3.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Metabion (Planegg, Deutschland) im Auftrag synthetisiert. Sie wurden anschließend in H_2O_{bidest} gelöst (100 pmol/µl) und bei -20 °C gelagert. Als Gebrauchslösung diente eine 1:20-Verdünnung (5 pmol/µl) der Oligonukleotide. In den folgenden Angaben (Tabelle 8) wurde die T_m den Herstellerangaben entnommen.

Tabelle 8: Oligonukleotide als PCR-Primerpaare. Aufgelistet sind die Bezeichnungen der verwendeten Oligonukleotide, die Anzahl der Nukleotide und die Schmelztemperatur der Sequenzen. Ihre Sequenzen wurden im Rahmen einer Kooperation mit Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) mitgeteilt und unterliegen der Geheimhaltungspflicht.

Oligonukleotid	Sequenzlänge	T_m [°C]
977-CAPS-DdeI-F	21	59
977-CAPS-DdeI-R	23	59
983-CAPS-TaqI-F	23	61
983-CAPS-TaqI-R	22	60
987-CAPS-TaqI-F	20	56
987-CAPS-TaqI-R	20	56
988-CAPS-HindIII-F	20	60
988-CAPS- HindIII-R	20	54
990-CAPS- HindIII-F	20	60
990-CAPS- HindIII-R	23	61
100-CAPS- DdeI-F	23	58
100-CAPS- DdeI-R	22	58
SNPflank983-C	33	66
SNPflank983-G	33	66
983-TaqI-R	22	60
SNPflank988-A	19	55

Oligonukleotid	Sequenzlänge	T_m [°C]
SNPflank988-T	19	55
988-HindIII-R	20	54
SNPflank990-A	25	63
SNPflank990-G	25	64
990-HindIII-R	23	61
SNPflank976-A	23	61
SNPflank976-T	23	61
SNPflank976-R	25	66
SNPflank977-A	16	48
SNPflank977-T	16	48
977-DdeI-R	23	56,5
SNPflank987-G	21	52
SNPflank987-A	21	50
987-TaqI-R	20	56
SNPflank100-T	20	58
SNPflank100-C	20	60
100-reverse2	25	61

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolation genomischer DNA aus Blattmaterial der Rebe

Zur Isolation genomischer DNA aus Reben, welche als Template zur Amplifikation interessanter Genbereiche diente, wurden etwa 0,5 cm^2 Gewebe möglichst junger Blätter abgenommen, in ein Reaktionsgefäß übertragen und über Nacht lyophilisiert. Anschließend wurde das Blattmaterial mit einer Metallkugel versetzt und in einem Orbitalschüttler zerkleinert. Zur DNA-Extraktion wurde das peqGOLD Plant DNA Mini Kit (VWR) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Zur Isolation genomischer DNA aus Reben für SSR-Marker-Analysen wurde das NucleoSpin® 96 Plant II-Kit von Macherey-Nagel entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

2.2.1.2 Isolation von RNA aus Blattmaterial der Rebe

Zur Isolation von RNA aus Blattmaterial, wurde das dritte Blatt einer Triebspitze verwendet. Daraus wurden drei Blattscheiben pro Genotyp und Wiederholung in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und dann unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mittels Mörser und Pistill zerkleinert. Dem Blattmaterial wurde je eine Spatelspitze PVP40 (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt) zum neutralisieren von Phenolen hinzugegeben. Zur Extraktion wurde das Spectrum™ Total RNA (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt) -Kit entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Um Verunreinigungen durch gDNA vorzubeugen, wurde unter Nutzung von DNaseI potenzielle gDNA abgebaut. Diese wurde nach dem ersten Waschschritt mit Waschpuffer 1 auf die Säule gegeben (2,5 µl *DNaseI*, 10 µl RDD Puffer, 87,5 µl $H_2O_{Nuclease\ frei}$) und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde zwei mal mit je 35 µl $H_2O_{Nuclease\ frei}$ eluiert. Konzentration und Reinheit wurden photometrisch bestimmt. Die Qualität wurde mittels Gelelektrophorese evaluiert. Die RNA wurde bis zum Versand an CeGat, Tübingen, bei -70 °C gelagert .

2.2.1.3 Design von Oligonukleotiden für PCR-Reaktionen

Für die Entwicklung von PCR-Primerpaaren wurde die betreffende Sequenz zunächst gegen das entsprechende Genom mittels CLC geblasted und nach möglichst SNP-reichen (engl. *single nucleotide polymorphism*) Regionen gesucht. Möglichst spezifische Fragmente, die sich für PCR-Primerpaare anboten, wurden ausgewählt und auf ihre Tauglichkeit für PCR-Reaktionen mittels Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2012) untersucht. Es wurde eine Fragmentlänge von 18-30 bp, eine Schmelztemperatur (T_m) von 57-63 °C und ein GC-Gehalt zwischen 40 und 50 % angestrebt. Anschließend wurde die Sequenz gegen PN40024 12X.v0 (Jaillon *et al*., 2007), im späteren Verlauf der Arbeit auch gegen Gf9921 und Gf9918, geblasted.

2.2.1.4 Design von genetischen Markern

Zur Erstellung spezifischer Marker innerhalb des *Rpv12*-Locus wurde die Genomsequenz des *Rpv12*-Locus der Haplotypen Gf9918 mit Hilfe des Online-Programms WebSat (Martins *et al.*, 2009) auf di-, tri-, tetra-, penta- und hexa-Repeats untersucht. Die Bereiche der Repeats mit etwa 500 bp flankierender Sequenz wurden gegen PN40024 12X.v0, den Haplotyp Gf9918 und den Haplotyp Gf9921 geblasted und auf möglichst SNP-reichen Sequenzabschnitten Oligonukleotide erstellt. Die Oligonukleotide wurden mittels Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2012) auf ihre Tauglichkeit untersucht. Es wurde eine Fragmentlänge von 18-30 bp, eine Schmelztemperatur (T_m) von 60 °C und ein GC-Gehalt zwischen 40 und 50 % angestrebt. Die Oligonukleotide wurden dann auf den Genotypen `Traminer´ und `Kunbarat´ mittels PCR getestet und anschließend auf einem umfangreichen Set von Genotypen mittels SSR-Marker-Analyse (2.2.2.4) hinsichtlich ihrer Spezifität für den *Rpv12*-Locus untersucht. Dafür wurden die *forward*-Primer mit Fluoreszenzmarkierung geordert (FAM, HEX, TAMRA, ROX).

2.2.1.5 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde mittels ClarioStar NanoPhotometer Absorptionsmessung bei 260 nm (A260) bestimmt. Dabei wird die Absorption der Proben über das Spektrum 210 – 760 nm analysiert. Weiterhin wurden jeweils die Quotienten A260/A280, A260/230 unter Berücksichtigung des Hintergrundes (A320) ermittelt. Der Quotient A260/A280 gibt Auskunft über Protein-Verunreinigungen, dabei soll der erwartete Wert zwischen 1,8 und 2 liegen, während der Quotient A260/230

die Reinheit der Probe in Bezug auf organische Substanzen ermittelt und über 1,5 liegen sollte.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Amplifikation gewünschter Genfragmente aus Rebsorten genutzt. Es wurden dafür die Polymerasen Dream*Taq*®, Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), Kapa2G Fast Multiplex Mix (Merck KGaA) SNP Pol DNA-Polymerase (Genaxxon), sowie das GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) als Thermocycler verwendet. Die Dream*Taq*-Polymerase wurde für Kolonie-PCR und CAPS-Marker-Analysen verwendet. Die SNP Pol DNA-Polymerase wurde zur Validierung der CAPS-Marker-Analyse genutzt, während die Phusion-Polymerase für Klonierungsarbeiten verwendet wurde. Der Kapa2G Fast Multiplex Mix wurde für SSR-Marker-Analysen verwendet.
Die Annealing Temperatur T_A wurde wurde stets über die angegebenen Schmelztemperaturen T_m des Primer-Herstellers Metabion (Planegg, Tabelle 8) ermittelt. T_A und Elongationszeit t_E wurden den Polymerase-Bedingungen entsprechend angepasst.

2.2.2.1 PCR mit der Dream*Taq* DNA Polymerase

Für die Ansätze mit der Dream*Taq* DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) wurde der in Tabelle 9 dargestellte Standard-Ansatz verwendet und die PCR entsprechend des in Tabelle 10 gezeigten Reaktionsschemas durchgeführt.

Tabelle 9: Standard-Ansatz mit Dream*Taq* DNA-Polymerase.

DNA (ca. 10 ng)	1,0	µl
Dream*Taq* Puffer 10x	2,0	µl
dNTPs (10 mM)	0,4	µl
Primer forward (5 pmol/µl)	2,0	µl
Primer reverse (5 pmol/µl)	2,0	µl
Dream*Taq* DNA-Polymerase	0,2	µl
H_2O_{bidest}	ad 20	µl

Tabelle 10: Reaktionsschema für Reaktionen mit Dream*Taq* Polymerase.

95	°C	1:00	min	
95	°C	0:30	min	x 35
T_A	°C	0:30	min	
72	°C	t_E	min	
72	°C	10:00	min	
4,	°C	∞	min	

2.2.2.2 PCR mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase

Für die Ansätze mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) wurde der in Tabelle 11 gezeigte Standard-Ansatz verwendet und die PCR entsprechend des in Tabelle 12 gezeigten Reaktionsschemas durchgeführt.

Tabelle 11: Standard-Ansatz mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

DNA (ca. 10 ng)	1,0	µl
Phusion GC Puffer® 5x	4,0	µl
dNTPs (10 mM)	0,4	µl
Primer forward (5 pmol/µl)	2,0	µl
Primer reverse (5 pmol/µl)	2,0	µl
Phusion DNA-Polymerase	0,2	µl
H_2O_{bidest}	ad 20	µl

Tabelle 12: Reaktionsschema mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

98	°C	0:30	min	
98	°C	0:10	min	x 35
T_A	°C	0:30	min	
72	°C	t_E	min	
72	°C	7:00	min	
4,	°C	∞	min	

2.2.2.3 PCR mit der SNP Pol DNA-Polymerase

Die SNP Pol DNA-Polymerase ist eine HiDi-Polymerase (engl. ***Hi****gh* ***Di****scrimination of single nucleotides*). Basierend auf SNPs (engl. *single nucleotide polymorphism*) kann sie zur allelspezifischen Diskriminierung verwendet werden. Dafür wurden identische Fragmente der Rebsorten/-genotypen jeweils mit zwei unterschiedlichen Forward-Primern amplifiziert, welche spezifisch an die unterschiedlichen SNPs binden. Der Standard-Ansatz ist in Tabelle 13 dargestellt. Das Reaktionsschema, nach welchem die PCR erfolgte, ist in Tabelle 14 gezeigt.

Tabelle 13: Standard-Ansatz mit der SNP Pol DNA-Polymerase.

DNA (ca. 10 ng)	X	µl
HiDi Puffer (10 x)	2,0	µl
dNTPs (10 mM)	0,4	µl
Primer forward (5 pmol/µl)	2,0	µl
Primer reverse (5 pmol/µl)	2,0	µl
Polymerase	0,5	µl
H_2O_{bidest}	ad 20	µl

Tabelle 14: Reaktionsschema mit der SNP Pol DNA-Polymerase.

95	°C	2:00	min	
95	°C	0:15	min	x 35
T_A	°C	0:10	min	
72	°C	t_E	min	
72	°C	10:00	min	
4,	°C	∞	min	

2.2.2.4 PCR für *Simple Sequence Repeats*-Marker-Analyse

Für *Simple Sequence Repeats*-Marker-Analysen wird die genomische DNA (gDNA) auf 1 ng/µl verdünnt und auf einer 96er oder 384er Well-Platte vorgelegt. Anschließend wird ein Reaktionsansatz entsprechend Tabelle 15 hinzugegeben und die PCR entsprechend des in Tabelle 16 dargestellten Schemas behandelt. Bei den Markern war jeweils der Forward-Primer mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert (FAM, HEX, TAMRA, ROX). Durch die Nutzung verschiedener Fluoreszenz-Markierungen können pro Ansatz bis zu acht unterschiedliche Marker gleichzeitig analysiert werden. Der genutzte Größenstandard wurde mit LIZ® markiert und ist mit dem kommerziell erwerblichen GeneScan™ 500 LIZ® identisch.
Es wurde jeweils eine 5 pmol/µl Konzentration der Primer verwendet. Je nach Farbstoff wurden 0,015 µl (FAM und HEX) bzw. 0,03 µl (ROX und TAMRA) markierte Oligonukleotide eingesetzt.

Tabelle 15: PCR für Simple Sequence Repeats-Längenpolymorphismen zur Marker-Analyse.

gDNA (1 ng)	1	µl
Primer for	0,015 - 0,03	µl
Primer rev	0,015 - 0,03	µl
PeqLab-Mastermix	2,5	µl
H_2O	Ad 5	µl

Tabelle 16: Reaktionsschema für Simple Sequence Repeats-Marker-Analyse.

95,0	°C	3:00	min	
95,0	°C	0:15	min	x 30
60,0	°C	0:30	min	
72,0	°C	0:30	min	
72,0	°C	7:00	min	
4,0	°C	∞	min	

Nach Durchführung der PCR wurden die Reaktionsansätze mit 10 µl $H_2O_{LiChrosolv}$ verdünnt und 1 µl der verdünnten Reaktion auf eine neue 96er oder 384er Well-Platte übertragen. Anschließend wurde die DNA mit 12,5 µl einer LIZ-Lösung (0,5 µl LIZ-Größenstandard und 12 µl $H_2O_{LiChrosolv}$) versetzt. Die Reaktionslösung wurde dann für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf 4 °C heruntergekühlt. Anschließend wurde die Platte in einen Kapillarsequenzierer (ABI 3130 xl, Applied biosystems, Invitrogen, Foster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten) mit einer 36 cm 16-Kanal-Kapillare überführt. Die Analyse der Fragmentlänge erfolgte unter Nutzung des Programms GeneMapper® 5.0 Software (Applied Biosystems, Invitrogen, Foster City, Kalifornien, USA).

2.2.2.5 Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Analyse

Die Amplifikation der mittels Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) -Marker zu analysierenden Fragmente erfolgte mit Dream*Taq*®-Polymerase (2.2.2.1). Das PCR-Produkt wurde im Anschluss direkt für eine Restriktionsanalyse entsprechend der Angaben von Thermo Fisher Scientific verwendet. (vgl. Tabelle 17).

Tabelle 17: Analytische Restriktion von PCR-Fragmenten.

PCR-Reaktion	10	µl
$H_2O_{LiChrosolv}$	17	µl
Puffer (10 x)	2	µl
Restriktionsenzym	1	µl

2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde abhängig von der Fragmentlänge ein 1-3 %iges Agarosegel verwendet (1 % für Fragmente >1 kb, 3 % für Fragmente <500 bp), welchem Serva DNA Stain G (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) entsprechend der Herstellerangaben zugegeben wurde. Das Gel wurde in eine mit 1 x TAE-Puffer (2.1.2) befüllten Gelelektrophorese-Kammer (Midicell® Primo EC330 Electrophoretic Gel System, E-C Apparatus Corporation, Holbrook, NY, USA) gelegt. Die Proben wurden vor Beladen der Taschen mit Ladepuffer (2.1.2) versetzt. Zur Orientierung und Abschätzung der Fragmentgrößen wurden je Gel zwei Taschen mit GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder oder GeneRuler™ LR (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) beladen. Die zur Auftrennung der Fragmente angelegte Spannung betrug 7-9 V/cm.
Anschließend wurde das Gel mit Hilfe des Quantum ST5 (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell) dokumentiert. Dabei wurde die gefärbte DNA mittels UV-Licht 360 ms belichtet und mit Hilfe des Programms VisionCapt (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell) als Bild aufgenommen.

2.2.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Anschließend wurde es mit dem Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) den Herstellerangaben entsprechend isoliert. Vor der Elution wurden die Säulen mit geöffnetem Deckel für 10 min bei 50° C inkubiert, um Ethanol-Reste zu entfernen. Die Konzentration wurde mit dem Clariostar Reader, entsprechend 2.2.1.5, photometrisch bestimmt.

2.2.3 Klonierung von PCR-Fragmenten

2.2.3.1 Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli*-Zellen (DH5α)

Für die Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen des Stammes DH5α wurden 20 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie von *E. coli* DH5α inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht (ü. N.) inkubiert. Anschließend wurden 200 ml LB-Medium mit 200 µl der ü. N.-Kultur inokuliert und ebenfalls bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Bei Erreichen der OD_{600} wurde die Kultur 30 min auf Eis gestellt, auf vier 50 ml Reaktions-Gefäße aufgeteilt und 10 min bei 4 °C und 1000 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 15 ml FSB-Puffer (2.1.2) resuspendiert. Der Inhalt von jeweils zwei Reaktions-Gefäßen wurde vereinigt und wieder für eine Stunde auf Eis gehalten. Dann wurden die Zellen 8 min, bei 4 °C und 1000 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen jeweils in 4 ml TBII-Puffer (2.1.2) resuspendiert. Nun wurden die kompetenten Zellen zu je 50 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung eingelagert (Hanahan, 1983, 1985).

2.2.3.2 Ligation

Für Ligationsansätze wurde das CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verwendet. Die Ligation erfolgte stets in einem Verhältnis von 1 zu 3 Vektor zu Insert-DNA-Sequenz. Die zu verwendende Menge der Insert-DNA-Sequenz wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Menge}_{\text{Insert}}(\text{ng}) = \frac{\text{MengeVektor (ng) x Länge Insert(bp)}}{\text{LängeVektor (bp)}} \text{ x } 3$$

Tabelle 18: Standard-Ligationsansatz. Aufgeführt sind hier die verwendeten Materialien und Volumina zur Durchführung einer Ligation.

Standard-Ligationsansatz		
Vektor (50-100 ng)	X	µl
Insert	X	µl
Ligase Puffer 10 x	2,0	µl
Ligase	1,0	µl
H_2O_{bidest}	Ad 20	µl

Die Ligation erfolgte für 1 h bei 22 °C und wurde anschließend bei 65 °C abgestoppt. Bis zur Transformation wurde sie bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.3 Transformation chemokompetenter *Escherichia coli*-Zellen (DH5α)

Der Ligationsansatz wurde im Anschluss an die Ligation für die Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen (DH5α) verwendet. Dafür wurden 4 µl des Ligations-Ansatzes zu je 50 µl auf Eis befindlichen, langsam aufgetauten *E. coli*-DH5α-Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit dem Ligationsansatz versetzt, für 30 min auf Eis

inkubiert und dann für 30 s bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min auf Eis gehalten und dann mit 450 µl LB-Medium (2.1.2) versetzt. Die Zellsuspension wurde unter sterilen Bedingungen in sterile Reagenzglasröhrchen mit lockerem Aluminium-Deckel überführt, um eine optimale Belüftung zu gewährleisten. Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37 °C. Durch diesen Schritt soll die Transkription und Translation der β-Lactamase stattfinden, welche den Zellen das Wachstum auf LB-Amp-Platten (2.1.2, zzgl. 100 µg/ml Ampicillin) ermöglicht. Die Zellen werden mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3.4 Kolonie-PCR zur Identifikation der Haplotypen bei Rebsorten

Zur Amplikon-DNA-Sequenzierung durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg) wurden Fragmente in pJet1.2 kloniert (2.1.3.4). Eine Voruntersuchung der Kolonien hinsichtlich der Allel-Identifizierung wurden mittel Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde mit einem autoklavierten Zahnstocher die Kolonie von der LB-Agar-Platte abgenommen und in ein Reaktionsgefäß übertragen. Anschließend wurde mit dem Zahnstocher ein kleiner Ausstrich auf einer LB-Amp-Platte (2.1.2 zzgl. 100 µg/ml) durchgeführt. In das Reaktionsgefäß wurde ein Reaktionsansatz mit Dream*Taq* DNA Polymerase 2.2.2.1 entsprechend Tabelle 9 gegeben und eine PCR nach Tabelle 10 durchgeführt.

Nach Auswahl der Kolonien mittels Kolonie-PCR und CAPS-Marker-Analyse (vgl. 2.2.2.5) wurde Material vom Ausstrich in eine Minikultur (5 ml LB (vgl. 2.1.2) zzgl. 100 µg/ml Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm auf einem Orbital-Schüttler inkubiert.

2.2.3.5 Plasmidpräparation

Zur Extraktion von Plasmid-DNA aus DH5α-*E.coli*-Zellen wurde je eine *E. coli*-Kolonie mittels steriler Pipettenspitze oder sterilem Holzstäbchen in 5 ml Schüttelkultur (LB-Medium, 2.1.2 zzgl. 100 µg/ml Ampicillin) gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml der Schüttelkultur entnommen, in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt, das Material bei >12.000 x g zentrifugiert und die Plasmide mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

2.2.3.6 Restriktion von Nukleinsäuren und Gelelektrophorese

Die mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit extrahierte Plasmid-DNA wurde mit den, mit Hilfe des Programms CLC Main Workbench 20 (Qiagen, Hilden), ermittelten Restriktionsenzymen restringiert. Für CAPS-Marker-Analysen wurden die Sequenzen und die CAPS-Marker freundlicherweise von *The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation*, Canberra, Australien (CSIRO), Dr. Ian Dry, zur Verfügung gestellt.
Die Restriktionsenzyme wurden nach den Angaben des Herstellers in den entsprechenden Puffern verwendet.

2.2.3.7 Analytische Restriktion von Plasmid-DNA

Der Standard-Ansatz für Restriktionen zu Analysezwecken ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Restriktionsansatz zu Analysezwecken.

DNA (250-500 ng)	X	µl
Enzympuffer 10 x	2,0	µl
Restriktionsenzym (10 U)	x	µl
H_2O_{bidest}	Ad 20	µl

Anschließend wurde der Ansatz für 1 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur im Heizschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe mit Ladepuffer (2.1.2) versetzt und auf ein Agarosegel (1-3 %) aufgetragen.

2.2.4 Pflanzenmaterial

2.2.4.1 Freiland-Pflanzen

Die Pflanzen, die für DNA-Extraktion und mikroskopische Analysen verwendet wurden (vgl. Tabelle 7), stehen wurzelecht auf dem Gelände des Julius Kühn-Instituts Geilweilerhof, Siebeldingen (49°12’54.1’’N, 8°02’41.3’’E).

2.2.4.2 Gewächshaus-Pflanzen - Stecklinge

Zweiaugen-Stecklinge ausgewählter Genotypen wurden jeweils im Dezember aus Ruten der Freilandpflanzen geschnitten. Die geschnittenen Hölzer wurden zunächst 4-5 h in

Wasser eingelegt und anschließend für 5 h in eine 0,7 % Beltanol-Lösung überführt, um Pilzinfektionen vorzubeugen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Hölzer in Tüten verwahrt. Die Hölzer wurden anschließend in Jiffy-7® Torfquelltöpfe gesteckt, der Austrieb im Gewächshaus unter Kunststofffolien auf Bodenheizung befördert und nach erfolgreicher Bewurzelung und Austrieb getopft. Genotypen mit viel *V. amurensis*-Hintergrund wurden in Rhododendronerde kultiviert, während *V. vinifera*-Sorten in Hawita Traysubstrat + Perlite-Erde gepflegt wurden.

2.2.5 *Plasmopara viticola* Sporangienmaterial

Sporangienmaterial von *P. viticola* für Infektionsversuche wurde von Blättern anfälliger Genotypen (u. a. `Spätburgunder´, `Müller Thurgau´, `Italia´, `Riesling´) genommen, welche im Freiland gewachsen und natürlich infiziert waren. Dafür wurden die Blätter gesammelt und in feuchten Kammern bei Dunkelheit über Nacht inkubiert. Die so ausgetriebenen Sporangien wurden dann mittels Wasserstrahlpumpe und Filterpipette abgesaugt, in ein Reaktionsgefäß übertragen und bis zur Nutzung bei -20 °C gelagert.
Zur Herstellung einer Sporensuspension für Inokulations-Versuche wurden die Sporangien in ein mit H_2O_{bidest} befülltes Glas überführt und die Konzentration mittels „Neubauer improved“ Zählkammer ermittelt. Eine Konzentration von 20.000-25.000 Sporangien/ml wurde angestrebt.

2.2.6 Vitalitätsfärbung

Zur Einschätzung der Vitalität der *P. viticola* Sporangien wurde eine Trypanblau-Färbung (0,5 % Trypanblau in 0,9 % NaCl) durchgeführt. Dafür wurden 64 µl einer Sporensuspension mit 36 µl einer Trypanblau-Lösung versetzt. Anschließend wurden die Sporangien mittels einer „Neubauer improved“ Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen) mit einer Kammertiefe von 0,1 mm ausgezählt. Die Endkonzentration der vitalen Sporangien sollte zwischen 20.000 und 25.000 Sporangien/ml liegen. Dabei wird die Vitalität anhand der Blaufärbung toter Sporangien beurteilt.

2.2.7 *Plasmopara viticola*-Zoosporen Separierung nach G. Buchholz

Zur Separierung von Zoosporen, entsprechend eines Protokolls nach Maike Müller (Masterarbeit, 2014) und Dr. Günther Buchholz (AlPlanta, Neustadt an der Weinstraße), wurde feine Aquarium-Filterwatte mit H_2O_{deion} gewaschen, dann in Isopropanol eingelegt, ausgedrückt und zwei Mal mit H_2O_{deion} gewaschen. Zum Trocknen wurde die Filterwatte

über Nacht im Abzug offen liegen gelassen. 300 mg der so behandelten Filterwatte wurden in eine 5 ml Pipettenspitze gestopft und bis zur Anwendung in einer Spitzenbox gelagert.

Die Sporangien wurden in autoklaviertem H_2O_{deion} suspendiert und über ca. 2 h bei Raumtemperatur bei regelmäßigem Rühren mit einem Glasstab inkubiert. Das Schlüpfen der Zoosporen wurde mittels „Neubauer improved“ Zählkammer überprüft. Wenn mehrere Zoosporen detektierbar waren, wurde die Sporangien-Zoosporen-Suspension über die Filterwatte-Spitze gegeben. Die so gewonnene Zoosporen-Suspension wurde für spezielle mikroskopische Aufnahmen verwendet, um störende Sporangien zu reduzieren.

2.2.8 Blattscheibentest

Zur Evaluierung der *P. viticola*-Anfälligkeit verschiedener Genotypen, wurden jeweils das dritte- und/oder das vierte Blatt von der Triebspitze abgenommen, mit H_2O_{deion} gereinigt und mittels Korkbohrer (1,5 cm) Blattscheiben ausgestanzt. Die Blattscheiben wurden dann auf 1 %-Wasseragar in quadratische Petrischalen gelegt und mit einer definierten Sporangiensuspension (vgl. 2.2.5) inokuliert. Die Blattscheiben wurden so zunächst in Dunkelheit über Nacht inkubiert. Anschließend wurde mittels Zellstofftuch das Inokulat abgenommen und die Platten zur Trocknung in die Sterilbank gestellt. Die Dokumentation der Blattscheibentests erfolgte zumeist mittels fotografischer Aufnahmen oder durch Stereomikroskopie.

2.3 Mikroskopie

2.3.1 Cellulose-Färbung mittels Calcofluor white

Calcofluor white bindet an β-1-3- und 1-4-Polysaccharide in Chitin und Cellulose, welches sich in der Zellwand von Pilzen, Pflanzen und Algen befindet.
Für die Färbung von oomycetischem Gewebe wurden Calcofluor white-Färbungen durchgeführt. Dafür wurden je Blattscheibe 20 µl einer Calcofluor white Lösung zusammen mit 20 µl einer 10 % KOH-Lösung appliziert. Ein Deckglas wurde aufgelegt und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Blattscheibe so lange mit Wasser gewaschen, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren (Protokoll Sigma Aldrich).
Die Proben wurden direkt nach der Färbung mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Nutzung eines GFP-Filters (engl. *green fluorescent protein*, λ=470 nm) dokumentiert.

Eine Kombination mit Anilinblau-Färbungen erfolgte indem den nach 2.3.2 gefärbten Blattscheiben 20 µl einer Calcofluor white Lösung appliziert wurde und die Lösung nach 1 min abgewaschen wurde.

2.3.2 Myzelfärbung mittels alkalischer Anilinblau-Färbung

Für die interzelluläre Färbung von pilzlichem Gewebe wurden die Blattscheiben für 3 h in 1 N KOH-Lösung bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden die Blattscheiben in H_2O_{deion} gewaschen und mit der Unterseite nach oben auf einen Objektträger gelegt. Die Blattscheiben wurden dann mit 50 µl einer Anilinblau-Lösung versetzt (vgl. 2.1.2). Nach 10 min wurde die Anilinblau-Lösung vorsichtig mit H_2O_{deion} abgewaschen, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren und die Probe mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Nutzung eines GFP-Filters (λ=470 nm) dokumentiert.

2.3.3 DNA- und RNA-Färbung mittels Acridin-orange und Ethacridinlactat nach G. Buchholz und M. Müller

Um frühe Infektionen und das Enzystieren von Zoosporen an den Stomata zu dokumentieren, wurde eine Acridin-Orange-Färbung mit Ethacridinlactat nach Dr. Günther Buchholz und Maike Müller (Masterarbeit, 2014, unveröffentlicht) durchgeführt.

Acridinorange ist ein Acridin-Farbstoff und interkaliert in DNA (Traganos *et al*., 1977). Es kann auch saure Kompartimente in Zellen anfärben. Ethacridinlactat (6,9-Diamino-2-ethoxyacridine-DL-lactate monohydrate) ist ein Antiseptikum und gehört ebenfalls zu den Acridinen (Wainwright, 2001; Junka *et al*., 2014). Es findet beispielsweise Anwendung als Rivanol-Lösung oder -Salbe (Dermapharm AG). Es hat eine antimikrobielle Wirkung, ist lichtempfindlich und bindet an DNA bzw. RNA. Dadurch verhindert es die Proteinbiosynthese von Bakterien. Ein DNA-Acridinorange-Komplex zeigt ein Absorptionsmaximum bei 502 nm und ein Emissionsmaximum bei 526 nm (grün). Der RNA-Acridinorange-Komplex zeigt ein Absorptionsmaximum bei 460 nm und ein Emissionsmaximum bei 650 nm (rot) (Informationen aus persönlichem Gespräch mit Dr. Günther Buchholz).

Für diese Färbung wurde eine Lösung aus Ethacridinlactat (0,01 %) und Acridinorange (0,005 %) (2.1.2) angesetzt. Zur besseren Handhabung wurden Stammlösungen erstellt: eine 0,1 % Ethacridinlactat-Stammlösung (in H_2O_{deion}) und eine 0,05 % Acridinorange-Stammlösung (in H_2O_{deion}). Sie wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die finale Färbelösung wurden von den Stammlösungen je 200 µl zusammengegeben und mit 1600 µl H_2O_{deion} versetzt. Die inokulierten Blattscheiben wurden, mit der Blattunterseite nach unten, für 10 min auf einer Tüpfelplatte mit 200 µl Farbstofflösung gelegt. Anschließend wurden die Blattscheiben drei Mal in je 500 µl H_2O_{deion} gewaschen. Die Präparate wurden auf einen Objektträger gelegt und direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie und GFP-Filter (λ=470 nm) ausgewertet.

2.3.4 Färbungen reaktiver Sauerstoffspezies

Für die Färbung reaktiver Sauerstoffspezies in inokulierten Blattscheiben wurden die Farbstoffe Nitrotetrazolium Blue Chlorid (NBT) und Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Die Färbelösungen wurden aufgrund ihrer Lichtempfindlichkeit jeweils frisch angesetzt. Die Probennahme der Blattscheiben erfolgte nach 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi.

2.3.5 Nitrotetrazolium Blue Chloride

Die Färbung mit Nitrotetrazolium Blue Chloride (NBT) erfolgte entsprechend dem Protokoll von Kumar *et al.*, 2014.

Die nach 2.2.7 inokulierten Blattscheiben wurden in 12-Well-Platten mit der Blattunterseite nach unten gelegt und jeweils mit 2 ml einer 0,2 % NBT-Lösung (0,1 g NBT in 50 ml Natrium-Phosphatpuffer ((50 mM), vgl. 2.1.2) versetzt. Die Blattscheiben wurden dann für 24 h in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden sie zum Bleichen in 100 % Ethanol gegeben, für 15 min in einem Wasserbad gekocht, in 50 % Ethanol gewaschen und auf einen Objektträger transferiert. Die entfärbten Blattscheiben wurden bis zur Dokumentation mittels Lichtmikroskopie DM4000B in einer feuchten Kammer im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.3.6 Diaminobenzidin

Die Färbung mit Diaminobenzidin (DAB) erfolgte entsprechend dem Protokoll von Daudi & O'Brien, 2012. Dafür wurden 50 mg DAB mit 45 ml sterilem H_2O_{deion} vermischt, um eine Endkonzentration von 1 mg/ml zu erreichen. Der pH-Wert wurde unter Rühren mittels eines Magnetrührers mit einer 0,4 N HCl-Lösung auf 3 eingestellt. Dies ist notwendig, um das DAB zu lösen. Anschließend wurden 25 µl Tween 20 (0,05 %) und 2,5 ml einer 200 mM Na_2HPO_4 (pH 6,8) hinzugeben und das Gesamtvolumen auf 50 ml angepasst. Der endgültige pH-Wert betrug 5,5.

Es wurden pro Genotyp jeweils drei mit *P. viticola* inokulierte Blattscheiben, die jeweils von 3 unterschiedlichen Klonen kamen, in eine 12-Well-Platte übertragen und jeweils

2 ml DAB-Lösung hinzugegeben. Weiterhin wurde pro Genotyp eine Blattscheibe mit DAB gefärbt, die nur mit H_2O_{deion} inokuliert war, sowie eine Blattscheibe, welche nur mit Na_2HPO_4-Puffer versetzt war.
Die 12-Well-Platten wurden ohne Deckel in einen Exsikkator gestellt und mittels Wasserstrahlpumpe für 15 min einem Vakuum ausgesetzt. Anschließend wurden die Well-Platten mit Alufolie bedeckt und für 4-5 h bei 80 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Zum Entfärben wurden die Blattscheiben in einer Bleichlösung (Ethanol, Essigsäure, Glyzerin im Verhältnis 3:1:1) in ein Wasserbad mit siedendem Wasser für 15 min gegeben und die Bleichlösung anschließend durch frische Lösung ersetzt. Nun wurden die Proben für weitere 30 min bei Raumtemperatur entfärbt. Die entfärbten Blattscheiben wurden auf Objektträger transferiert und bis zur Dokumentation mittels Lichtmikroskopie DM4000B (Leica, Wetzlar) in einer feuchten Kammer bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.3.7 Lignin und Suberin-Färbung mittels Auramin O

Mit Auramin O können Lignin und Suberin angefärbt werden (Pesquet *et al.*, 2005; Ursache *et al.*, 2018). Dafür werden zunächst die inokulierten Blattscheiben sowie Kontrollen in $EtOH_{absolut}$ für 15 min in siedendem Wasser gebleicht. Anschließend werden die entfärbten Blattscheiben in einer 0,1 % Auramin O-Lösung für 24 hpi bei Raumtemperatur und 50 rpm im Schüttelinkubator gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit einem GFP-Filter (λ=470 nm). Da *P. viticola*-Strukturen zu frühen Infektionszeitpunkten nur durch enzystierte Zoosporen nachzuweisen sind, wurde anschließend eine Calcofluor white-Färbung durchgeführt. Dafür wurden die bereits analysierten Proben mit 10 µl 1 N KOH und 10 µl Calcofluor white-Färbelösung versetzt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit einem GFP-Filter (λ=470 nm).

2.3.8 Kallose-Färbung

Das Polysacchharid Kallose, ein β-1,3-Glucan, wird häufig von Pflanzen an den Zellwänden akkumuliert. Ihm wird eine Rolle bei der Pflanzenabwehr zugeschrieben. 2003 wurde Kallosebildung an den Stomata einer resistenten Rebsorte (`Solaris´, *Rpv3.3* und *Rpv10*) beobachtet (Gindro *et al.*, 2003). Daher wurden im Rahmen der Untersuchungen zum Wirkmechanismus des Resistenzlocus *Rpv12* verschiedene Kallosefärbungen durchgeführt.

Vor der Färbung wurden die inokulierten Blattscheiben (2.2.7 & 2.2.8) in 100 % Ethanol für 15 min in einem Wasserbad mit siedendem Wasser entfärbt.

2.3.9 Kallosefärbung mittels Resorcinblau

Die entfärbten Blattscheiben wurden für 10 min mit je 50 µl einer Resorcinblau-Lösung benetzt. Dafür wurden 100 ml einer 1 % wässrigen Resorcinblau-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt) mit 0,1 ml konzentriertem Ammoniak (25 %) versetzt. Die nun angefärbte Kallose zeigte sich kobaltblau. Anschließend wurden die Blattscheiben so lange gewaschen, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren (Mulisch & Welsch, 2015)

2.3.10 Kallosefärbung mittels Anilinblau

Die entfärbten Blattscheiben wurden für 30 min mit je 50 µl einer Anilinblau-Lösung benetzt. Diese bestand aus 150 mM K_2HPO_4 (pH 9,5) und 0,01 % Anilinblau. Anschließend wurden die Blattscheiben so lange gewaschen, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren (Mulisch & Welsch, 2015).

2.3.11 Statistische Auswertung des Myzelwachstums unter Nutzung einer Anilinblau-Färbung

Um das Myzelwachstum verschiedener Genotypen miteinander zu vergleichen, wurden je drei Blattscheiben von je drei Blättern pro Genotyp analysiert. Dafür wurden die Blattscheiben, die entsprechend 2.2.5 & 2.2.7 mit Zoosporen inokuliert worden waren, nach 2.3.2 mittels alkalischer Anilinblau-Färbung vorbereitet. Von jeder Blattscheibe wurden fünf Bilder mit 100-facher Vergrößerung mittels Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Da durch die alkalische Anilinblau-Färbung auch Blattadern angefärbt werden, welche die Myzelauswertung stören, wurden diese mit Hilfe des Programms paint.net (Version 4.2.14) händisch geschwärzt. Die so bearbeiteten Abbildungen wurden dann mittels Fiji (ImageJ-win64, Schindelin *et al.*, 2012) analysiert. Hierfür wurden zwei Makros erarbeitet, die im Anhang 6.1.1, 6.1.2 aufgeführt sind. Für die Genotypen Hozy01 und Hozy10 musste aufgrund des sehr geringen Myzelwachstums ein etwas abgewandeltes Makro verwendet werden. Letztlich wurde zur Auswertung ein Binärbild erstellt, in welchem das Myzel in Form von weißen Pixeln dargestellt und die weißen Pixel gezählt werden. Die Ergebnisse der einzelnen Bilder wurden mittels eines Makros (vgl. 6.1.3) in einer Excel-Tabelle zusammengefügt und in Verhältnis zur Gesamtpixelzahl (4.915.200 Pixel) der Abbildungen gesetzt, sodass die relative Myzelabdeckung im Bild prozentual ermittelt werden konnte. Anschließend wurden statistische Analysen mit R durchgeführt (Version 4.0.3; R Core Team, 2020; https://www.R-project.org/). Die Normalverteilung wurde mittels Shapiro-Test analysiert

und wenn nötig mittels *log* bei Linksverschiebung und *sqrt* bei Rechtsverschiebung, transformiert. Anschließend wurde die Signifikanz mittels Welch's t-Test ermittelt.

2.4 DNA-Sequenzierung des Genotyps 2014-099-0003

Da eine effiziente Analyse des Resistenzlocus *Rpv12* auf Grundlage des Referenzgenoms PN40024 nicht möglich war, wurde die DNA-Sequenzierung eines *Rpv12*-tragenden Genotyps beschlossen. Hierfür wurde der Genotyp 2014-099-0003 gewählt, welcher ein Kreuzungsprodukt der Genotypen 2004-043-0021 (♀) und 65-153-18 (♂) ist. Der maternale Genotyp 2004-043-0021 ist eine Kreuzung aus GF.84-58-988 (`Regent´(*Rpv3.1*) x `Domina´) und MTP3082-1-49 (*Run1*/*Rpv1*-Träger, *Muscadinia*-Rückkreuzung von Alain Bouquet) und Träger der Resistenzloci (*Rpv1*, *Rpv3.1*, *Run1*, *Ren3*, *Ren9*). Der paternale Genotyp 65-153-18 ist eine Kreuzung aus 4/15 und `Lemberger´. 4/15 ist eine interspezifische Kreuzung aus Ungarn (Koleda, 1975) zwischen *V. vinifera* und *V. amurensis*. Soweit aus der Züchtungsdokumentation ersichtlich handelt es sich bei 4/15 um ein Geschwister des Genotyps 28/19, welcher laut Literaturangaben Elterpflanze von `Kunbarat´ und `Kunleany´ ist, weshalb es sich bei dem *Rpv12*-Locus von 65-153-18 und `Kunbarat´ um das gleiche Allel handeln sollte. 65-153-18 ist Träger der Resistenzloci *Rpv12* und *Rcg1*. Das Kreuzungsprodukt 2014-099-0003 verfügt, wie Markerdaten belegen, über die Resistenzloci *Ren3*, *Ren9*, *Rpv12* und *Rcg1.*

Die DNA-Sequenzierungen und die bioinformatische Analyse erfolgten in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln (Dr. Bruno Hüttel) und CeBiTec in Bielefeld (Dr. Bernd Weisshaar, Dr. Daniela Holtgraewe, M. Sc. Bianca Frommer).

Für die DNA-Sequenzierung wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: *Illumina Sequencing* (Durchführung erfolgte durch CeBiTec Bielefeld, 2 x 150 bp *paired-end* auf NextSeq 500 Illumina (Illumina, San Diego, USA)) und *Single Molecule Real Time-Sequencing* (SMRT) auf einem Sequel I sequencer (Pacific Biosciences of California, Inc., USA; Durchführung erfolgte am Max-Planck-Gesellschaft, Genomzentrum, Köln).

Zur Phasentrennung der SMRT-Reads des Genotyps 2014-099-0003 wurde das Verfahren *Trio Binning* nach Koren *et al.*, 2018, verwendet, welches den Sequenzoutput zweier verschiedener Sequenziertechniken miteinander verrechnet. Die bioinformatischen Arbeiten erfolgten am *CeBiTec* Bielefeld durch M. Sc. Bianca Frommer.

2.4.1 Illumina DNA-Sequenzierung

Das erste gesamte Genom, das sequenziert wurde, war das des Phagen PhiX174 1977. Ein Phage, der Bakterien der Art *Escherichia coli* befällt. Sein Genom umfasst 5386 Basenpaare, welche für 11 Proteine kodieren (Sanger, 1977). 1988 startete dann das „human genome project“, bei welchem die Entschlüsselung des Human-Genoms im Fokus stand. Dieses wurde 2003 beendet. Es entwickelten sich neue Sequenziermethoden die heute unter „Next Generation Sequencing“ zusammengefasst werden. Der prominenteste Vertreter ist die Illumina-DNA-Sequenzierung, welche das Prinzip der Brückensynthese nutzt. Dabei wird die zu sequenzierende, doppelsträngige DNA mit unterschiedlichen Adapter-DNA-Sequenzen ligiert, denaturiert, einzelsträngig auf eine Trägerplatte ligiert und amplifiziert. Dabei wird der reverse Strang abgewaschen, sodass nur einzelsträngige Fragmente im Cluster sind, die durch die Adapter an die Flow-Cell gebunden sind. Auf der Trägerplatte entstehen so Cluster, die innerhalb des Clusters viele Kopien einer einzelsträngigen Sequenz aufweisen. Die DNA-Sequenzierung erfolgt dann durch die Bindung fluoreszierender dNTPs und ihrer Detektion. Die Illumina-DNA-Sequenzierung hat eine äußerst geringe Fehlerrate, bietet aber nur eine geringe Read-Länge von etwa 100 bp.

2.4.2 Single Molecule Real Time DNA-Sequenzierung

Bei der *Single Molecule Real Time* (SMRT) -DNA-Sequenzierung handelt es sich um eine 2011 kommerzialisierte Methode der DNA-Sequenzierung, bei welcher die Amplifikation der DNA entfällt (Karow, 2011). Dabei sind Nanoporen in einer Membran eingelagert, sogenannte Zero-Mode Waveguides (ZMWs). Dabei handelt es sich um zylindrische Kammern, welche ein Detektionsvolumen von 20 Zeptoliter bieten. Am Boden der Kammer befindet sich eine Polymerase sowie das einzelsträngige DNA-Molekül. DNTPs sind unterschiedlich fluoreszierend markiert. Wird eines der Nukleotide in die DNA eingebaut, wird das Label, das am Phosphat sitzt abgespalten und detektiert. Nukleotide, die nicht gebunden sind, werden entsprechend nicht zur Fluoreszenz angeregt. Das Licht der Nukleotide erreicht nur etwa 20-30 nm der ZMW, wodurch ein mögliches Hintergrundrauschen inhibiert wird. Die Read-Länge beträgt etwa 15.000 bp, während die Laufzeit verhältnismäßig kurz ist. Dafür muss aber eine relativ hohe Fehlerrate erwartet werden.

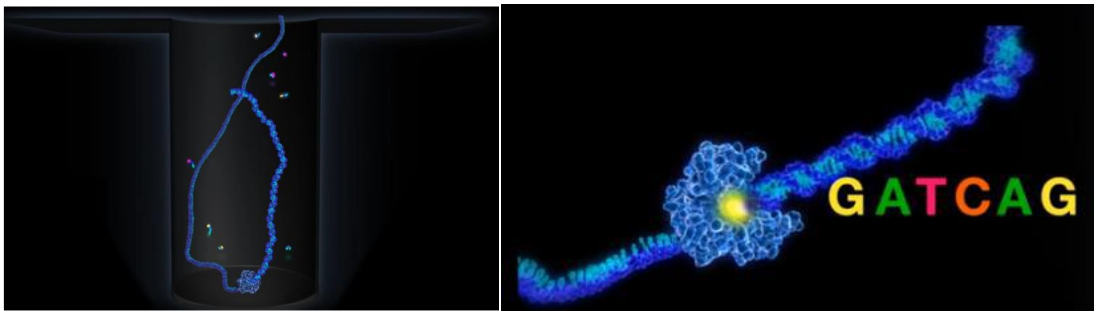


Abbildung 8: *Single Molecule Real Time* DNA-Sequenzierung. Gezeigt ist rechts eine *Single Molecule Real Time* (SMRT)-Zelle, an deren Boden sich eine Polymerase befindet. DNTPs sind farblich markiert und die Fluoreszenz-Marker werden bei Einbau in die DNA abgespalten. Dieses Lichtsignal wird detektiert und somit die DNA-Sequenz ermittelt. Rechts ein Detailschema der Polymerase mit DNA. Die Bilder wurden dem Video „Introduction to SMRT Sequencing“ von PacBio (Pacific Bioscience of California, Inc., USA) entnommen (https://www.youtube.com/watch?v=NHCJ8PtYCFc).

2.4.3 Trio Binning

Das erste Referenzgenom der Rebe wurde 2007 publiziert. Hierfür wurde eine weitgehend homozygote Selbstungslinie von `Pinot Noir´ verwendet: PN40024 (Jaillon *et al.*, 2007; Canaguier *et al.*, 2017). Da es sich bei der Rebe um einen diploiden Organismus handelt, ist es schwierig die DNA den verschiedenen parentalen Haplotypen, die äußerst heterozygot sind, zuzuweisen (2n=38, ~475 Mb) (Lodhi & Reisch, 1995). Der Haplotyp ist hier definiert, als der Teil der DNA eines Genotyps, der jeweils einem Elter-Genotyp zugeordnet werden kann. Das Gesamtgenom des Genotyps 2014-099-0003 differenziert sich entsprechend in den paternalen (Gf9918) und den maternalen (Gf9921) Haplotyp. Dieses Problem wurde beim Referenzgenom PN40024 umgangen, indem man hier einen weitgehend homozygoten Genotypen wählte. Um Haplotypen-differenzierte Genanalysen durchzuführen, wurde 2018 die bioinformatische Methode des Trio Binnings durch Koren *et al.* entwickelt. Dabei werden zunächst *long reads* einer Rebsorte produziert und anschließend mittels Illumina die elterlichen Genotypen sequenziert.

Anschließend werden die *long reads* unter Nutzung von *Illumina-Reads* den parentalen Haplophasen zugeordnet. Sodass die parentalen Haplotypen getrennt assembliert werden können, wobei ein diploides Genomassembly des Nachkommen-Genotypen (Gf99-03) entsteht.

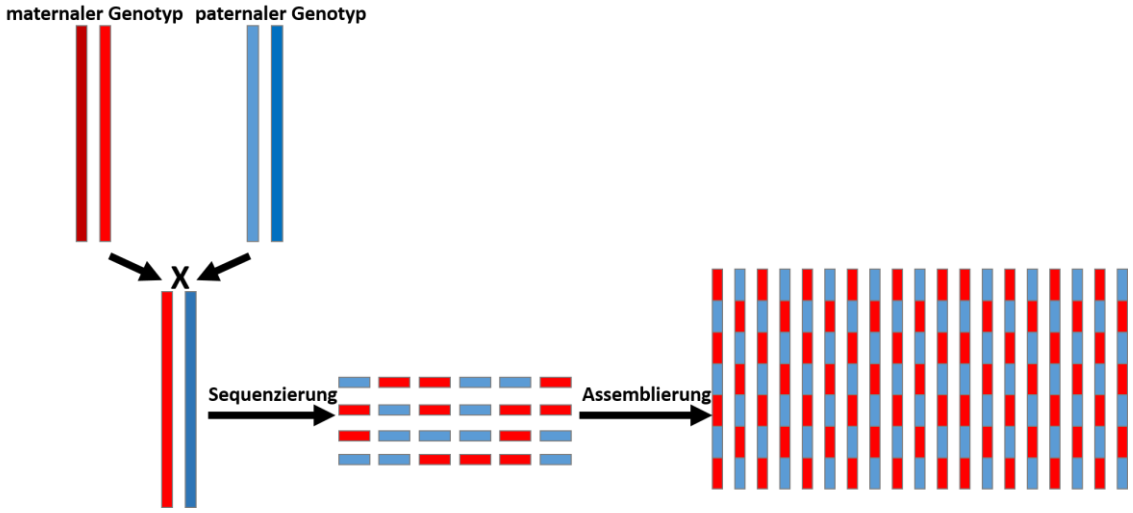


Abbildung 9: Klassische Assemblierung, wie sie bei PN40024 12X.v2 angewendet wurde. Bei heterozygoten Genotypen käme es zu einem Mosaik-Genom. Dies wurde bei PN40024 12X.v2 vermieden, indem man einen weitgehend homozygoten Genotypen wählte. Verändert nach Koren *et al.*, 2018 und Frommer *et al.*, unveröffentlicht.

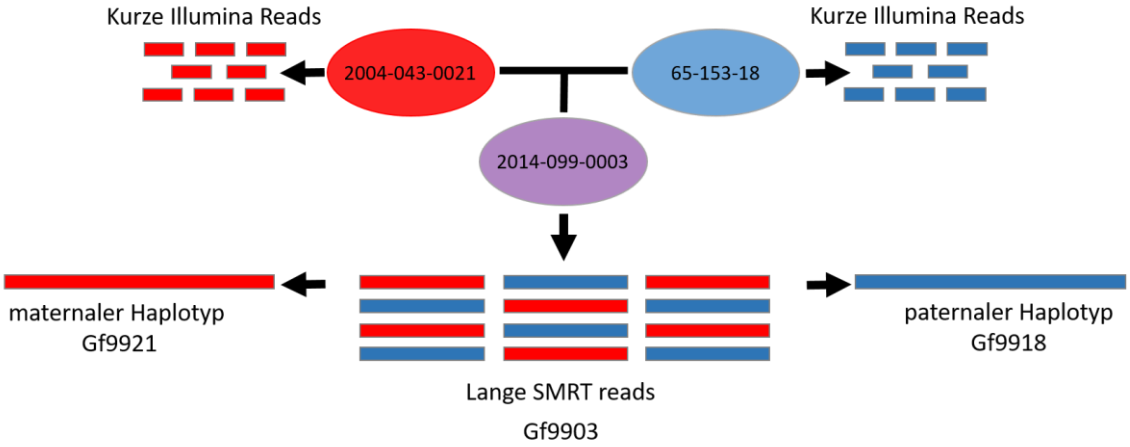


Abbildung 10: Schematische Übersicht der verwendeten Sequenziertechniken. Die parentalen Genotypen 2004-043-0021 (rot) und 65-153-18 (blau) wurden mittels Illumina sequenziert, wodurch kurze *Illumina-reads* entstanden. Das Kreuzungsprodukt (violett) wurde mittels einer SMRT-Sequenzier-Technologie sequenziert, wodurch lange *Reads* entstanden. Die langen *Reads* wurden dann unter Nutzung der kurzen *Illumina-Reads* den unterschiedlichen parentalen Haplotypen (Gf9921 und Gf9918) zugeordnet. Verändert nach Koren *et al.*, 2018 und Frommer *et al.*, unveröffentlicht.

3 Ergebnisse

3.1 Abstammungsanalyse von `Kunbarat´

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Ergebnisse wurden bereits in der Zeitschrift „Vitis-Journal of Grapevine Research“ im Rahmen einer „Research Note“ publiziert (Müllner *et al.*, 2020).

Zur detaillierten Analyse eines Resistenzlocus ist die Klärung seiner Herkunft und die Kenntnis der damit verbundenen Verwandtschaften förderlich. Daher wurde zunächst der Stammbaum der *Rpv12*-Träger `Kunbarat´ und `Kunleany´ (Kreuzungen von 1960) mittels SSR-Markeranalyse überprüft.

Dafür wurde Pflanzenmaterial der Genotypen `Afus Ali´, `Irsai Oliver´, `Italia´, `Kunbarat´, `Kunleany´, `Kozma Csft 2423´, `Lela´, `Mila´, `Muscat Ottonel´, `Pannonia Kincse´, `Petra´, `Rani Rizling´, `Savagnin blanc´, `Seyval´, `Sremski Karlovci 77 4-5´, `Welschriesling´ und `Zlata´ von den Freilandflächen der Rebsortensammlung Geilweilerhof entnommen und getestet. Die Auswahl der Genotypen basierte auf dem von Venuti *et al.* 2013 angefertigten Stammbaum und Daten des *VIVC*. Das Blattmaterial wurde lyophilisiert, gemörsert und die DNA wie in 2.2.1.1 beschrieben isoliert.

Entsprechend 2.2.2.4 wurden PCR-Reaktionen mit insgesamt 80 SSR-Markern durchgeführt. Die hierfür verwendeten Primersequenzen sind publiziert und in der Datenbank des National Centre for Biotechnology Information (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe) verfügbar. Die Amplifikate wurden mittels ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) aufgetrennt und anschließend mit dem Programm GeneMapper® 5.0 (Applied Biosystems, USA) analysiert. Die detaillierten Markerdaten dazu finden sich im Anhang dieser Arbeit (6.2). Die Verwandtschaftsbeziehungen wurden mit der Software ML Relate (Kalinowski *et al.,* 2006) statistisch ausgewertet. Dabei konnte festgestellt werden, dass der bisher gezeichnete Stammbaum des *Rpv12*-Trägers `Kunbarat´ nicht korrekt ist: Während für `Kunbarat´ `Italia´ als Eltern-Pflanze angenommen wurde (Koleda, 1975), zeigte sich, dass `Kunbarat´ und `Kunleany´ Vollgeschwister sind und sie beide von dem Hybriden 28/19 sowie der libanesischen Sorte `Afus Ali´ abstammen. Da der Hybrid 28/19 nicht mehr existiert bzw. eine Pflanzung dieser Sorte nicht mehr bekannt ist, konnte allerdings nur die Verwandtschaft mit `Afus Ali´ überprüft werden. Weiterhin zeigte sich, dass die Rebsorte `Petra´ (Serbien, 1977) nicht von `Pinot Noir´ und `Kunbarat´ abstammt, sondern von `Kunbarat´ und `Savagnin blanc´. Damit ist sie ein Vollgeschwister von

`Sremski Karlovci 77 4-5´ (Serbien, 1977). Die Verwandtschaftsverhältnisse sind detailliert in Abbildung 11 dargestellt. Genotypen, deren DNA nicht zur Verfügung stand, sind grau unterlegt. Weiterhin wurde mittels ML-Relate eine Verwandtschaftsanalyse durchgeführt (Daten nicht gezeigt, Müllner *et al*., 2020).

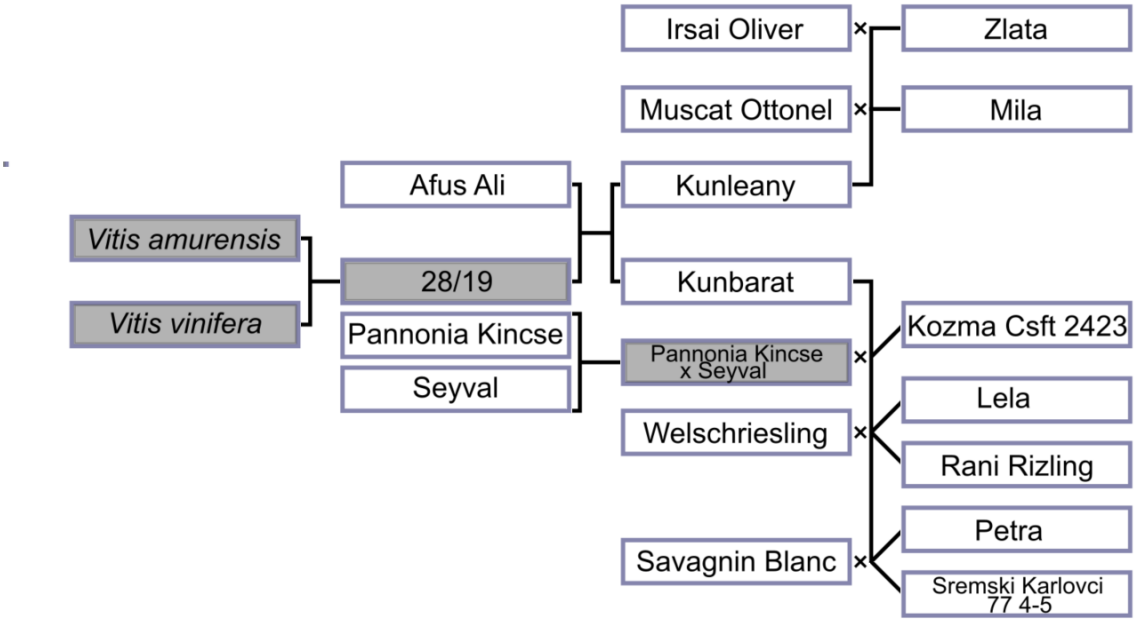


Abbildung 11: Stammbaum des Genotyps `Kunbarat´. Genotypen, deren DNA nicht für Prüfungen zur Verfügung stand, wurden grau unterlegt (Müllner *et al*., 2020).

3.2 Mikroskopische Untersuchung des Infektionsverlaufs

Um Hinweise auf die Resistenzmechanismen zu erarbeiten, war es ein Hauptaspekt dieser Arbeit, das Infektionsgeschehen von *P. viticola* detailliert auf resistenten Rebsorten nachzuverfolgen. So wurden insbesondere *Rpv12*-Träger analysiert. Hierfür wurden verschiedene Färbungen zur mikroskopischen Analyse durchgeführt.

Die Genotypen `Afus Ali´ und `Italia´ verfügen über keine Resistenz-Eigenschaften und dienten somit als anfällige Referenzsorten. `Kunbarat´, `Kunleany´, 2014-099-0003 und 65-153-18 tragen den *Rpv12*-Locus heterozygot. `Kunbarat´, 65-153-18 und 2014-099-0003 tragen außerdem *Rcg1*, einen Locus, der eine Resistenz gegen *Agrobacterium tumefaciens* verursachte Pflanzentumore vermittelt (engl. *Resistance crown gall disease*) und 2014-099-0003 weist noch als dritten und vierten Resistenzlocus *Ren3* sowie *Ren9* auf.

Die Genotypen Hozy01 und Hozy10 tragen den Locus *Rpv12* homozygot. Hozy10 trägt weiterhin den Locus *Rpv3.1* homozygot. Der Genotyp 2004-043-0021 ist Träger der Loci *Run1*/*Rpv1 Rpv3.1*, *Ren3* und *Ren9*. Weitere Analysen wurden mit einem Genotyp durchgeführt, dessen genetischer Hintergrund nicht hinreichend geklärt ist. Vermutlich handelt es sich dabei um eine Kreuzung aus *V. riparia* und *V. rupestris*. Alle mikroskopischen Analysen wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit mindestens drei Blattscheiben in mindestens zwei Durchläufen von Testinokulationen analysiert. Es wurden stets mit H_2O_{deion} inokulierte Negativkontrollen mitgeführt. Die Dokumentation erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, nach 24, 48 und 72 hpi.

3.2.1 RNA und DNA-Färbung mittels Acridinorange und Ethacridinlactat

Um mögliche frühe Abwehrmechanismen der Rebe gegenüber *Plasmopara viticola* zu dokumentieren, wurde eine Färbemethode verwendet, die von Dr. Günther Buchholz und Maike Müller (Masterarbeit, 2014) entwickelt worden war (vgl. 2.2.7). Dabei färben die Stoffe Acridinorange und Ethacridinlactat DNA und RNA an. Die Genotypen `Afus Ali´, `Italia´, `Kunbarat´, `Kunleany´, Hozy01, Hozy10, 2004-043-0021, 65-153-18 und 2014-099-0003 wurden hierfür mit einer Zoosporen-Suspension inokuliert, welche entsprechend 2.2.5 und 2.2.7 hergestellt wurde. Die Konzentration der Sporangien wurde mittels Neubauer Zählkammer bestimmt und eine Konzentration von 20.000-25.000 Sporangien eingestellt. Es erfolgte eine Inokulation von 2 h. Die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 12 zeigen deutlich, dass die Zoosporen (gelb) die Stomata (blau) erreichen und Keimschläuche ausbilden. Weitere Reaktionen konnten bei den hier beschriebenen Genotypen innerhalb dieser Zeitspanne nicht beobachtet werden.

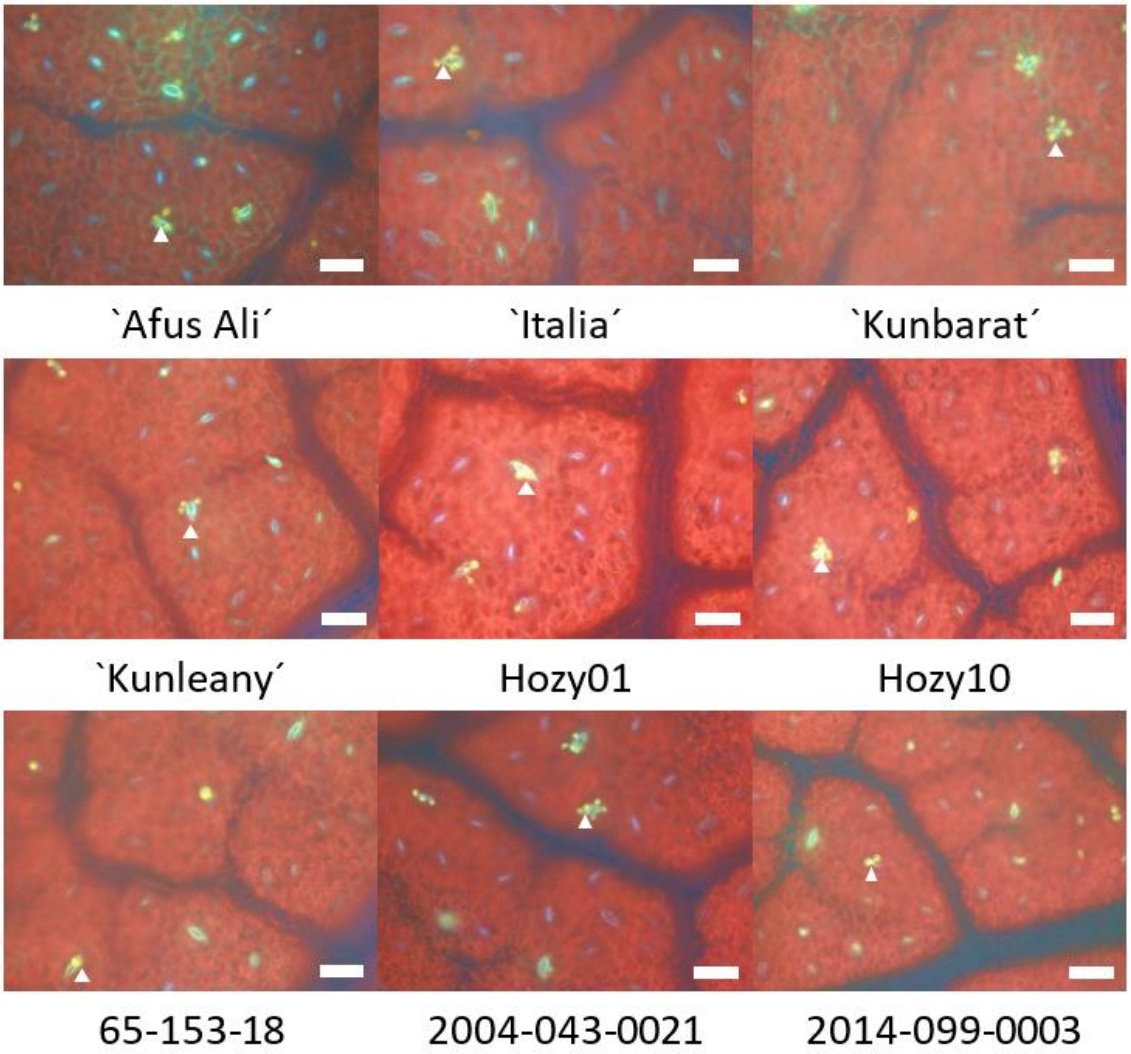


Abbildung 12: Mikroskopische Analyse mittels Acridinorange-Färbung. Zu sehen sind Zoosporen (gelb) die 2 h nach Inokulation die Stomata erreicht haben und mittels Keimschlauch penetrieren. Es wurde für die Abbildungen eine 200-fache Vergrößerung verwendet. Die Größenreferenz entspricht 50 µm. Die tatsächliche Bildgröße beträgt 435,50 x 326,63 µm. Zoosporen sind mit weißen Pfeilspitzen markiert.

3.2.2 Lignin und Suberin-Färbung mittels Auramin O

Um eine mögliche Verstärkung der pflanzlichen Zellwand zu dokumentieren, erfolgte eine Färbung mit Auramin O (vgl. 2.3.7) nach 24 hpi. Dieser Versuch wurde nur einmal, jedoch mit drei biologischen Wiederholungen, durchgeführt. Um nachzuweisen, dass Zoosporen an die Stomata gelangt sind, wurde bei den zuerst mittels Auramin O gefärbten Blattscheiben mit Calcofluor white nachgefärbt.

Es konnte kein offensichtlicher Unterschied hinsichtlich der Lignin-Einlagerung zwischen den Genotypen detektiert werden. Jedoch ist bei den *Rpv12*-tragenden Genotypen 65-153-18 und 2014-099-0003 ein deutlicher brauner Hof um infizierte Stomata zu sehen.

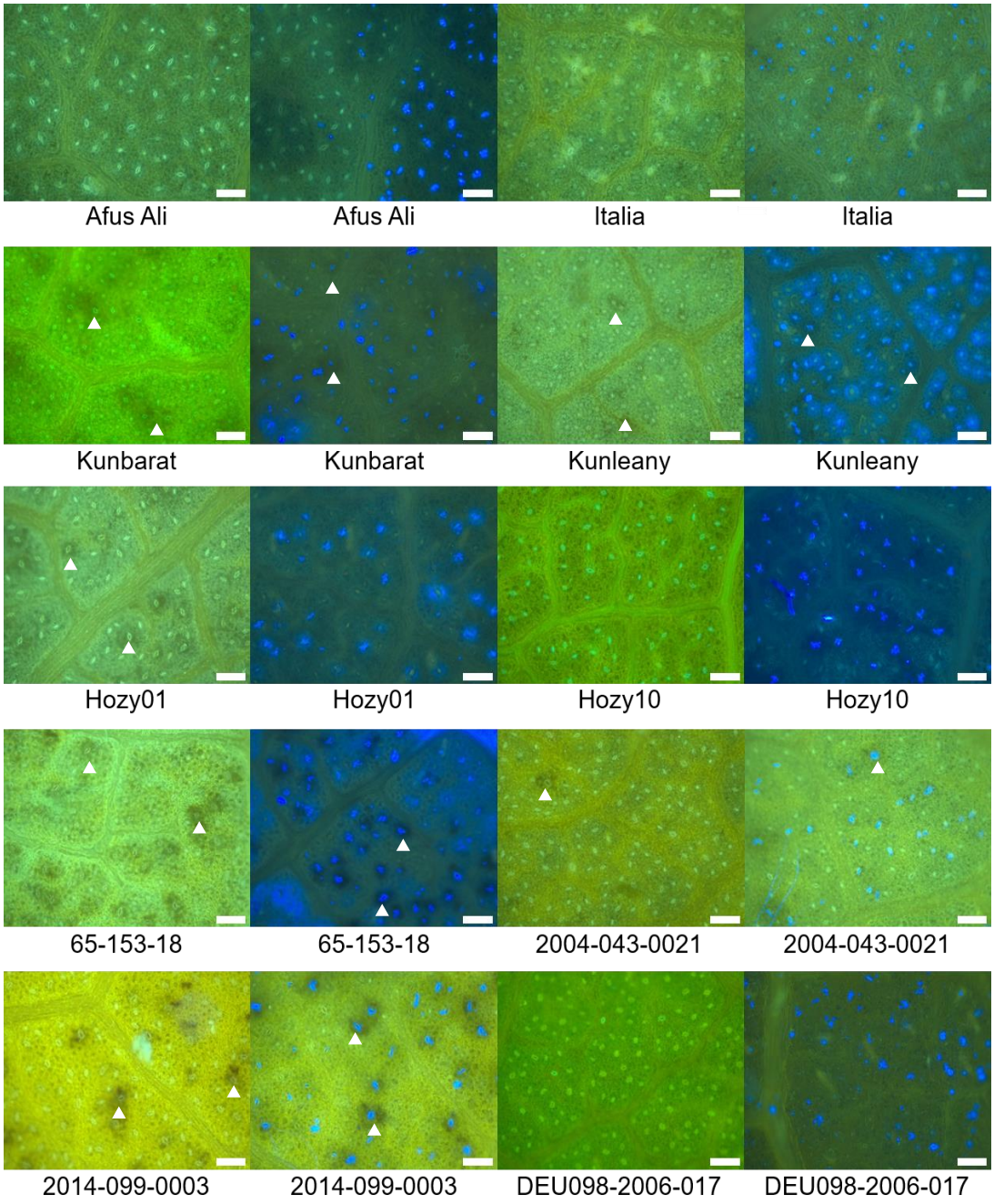


Abbildung 13: Auramin O-Färbung nach 24 hpi. Links ist jeweils eine Färbung mit Auramin O gezeigt, rechts daneben ist derselbe Genotyp zusätzlich mit Calcofluor white angefärbt. Lignin soll durch Auramin O grün gefärbt sein, Zoosporen sind durch Calcofluor white blau gefärbt. Der Bildausschnitt ist jeweils 871,00 x 653,25 µm groß. Die Größenreferenz entspricht 100 µm. Nekrosen sind mit weißen Pfeilspitzen markiert.

3.2.3 Myzeldokumentation von *Plasmopara viticola* mittels Anilinblau-Färbung

Zur detaillierten Dokumentation des interzellulären Wachstums von *P. viticola* wurden inokulierte Blattscheiben nach 6 (nicht gezeigt), 24, 48 und 72 hpi in 1 N KOH-Lösung eingelegt und für 3 h bei 65 °C gebleicht. Anschließend wurden sie mit einer Anilinblau-Lösung (vgl. 2.3.2) gefärbt und mit einem Fluoreszenz-Mikroskop dokumentiert. Bereits nach 2 hpi haben Zoosporen die Stomata erreicht und einen Keimschlauch ausgebildet (vgl. 3.2.1). Verzweigungen und die Ausprägung von Haustorien sind zu beobachten.

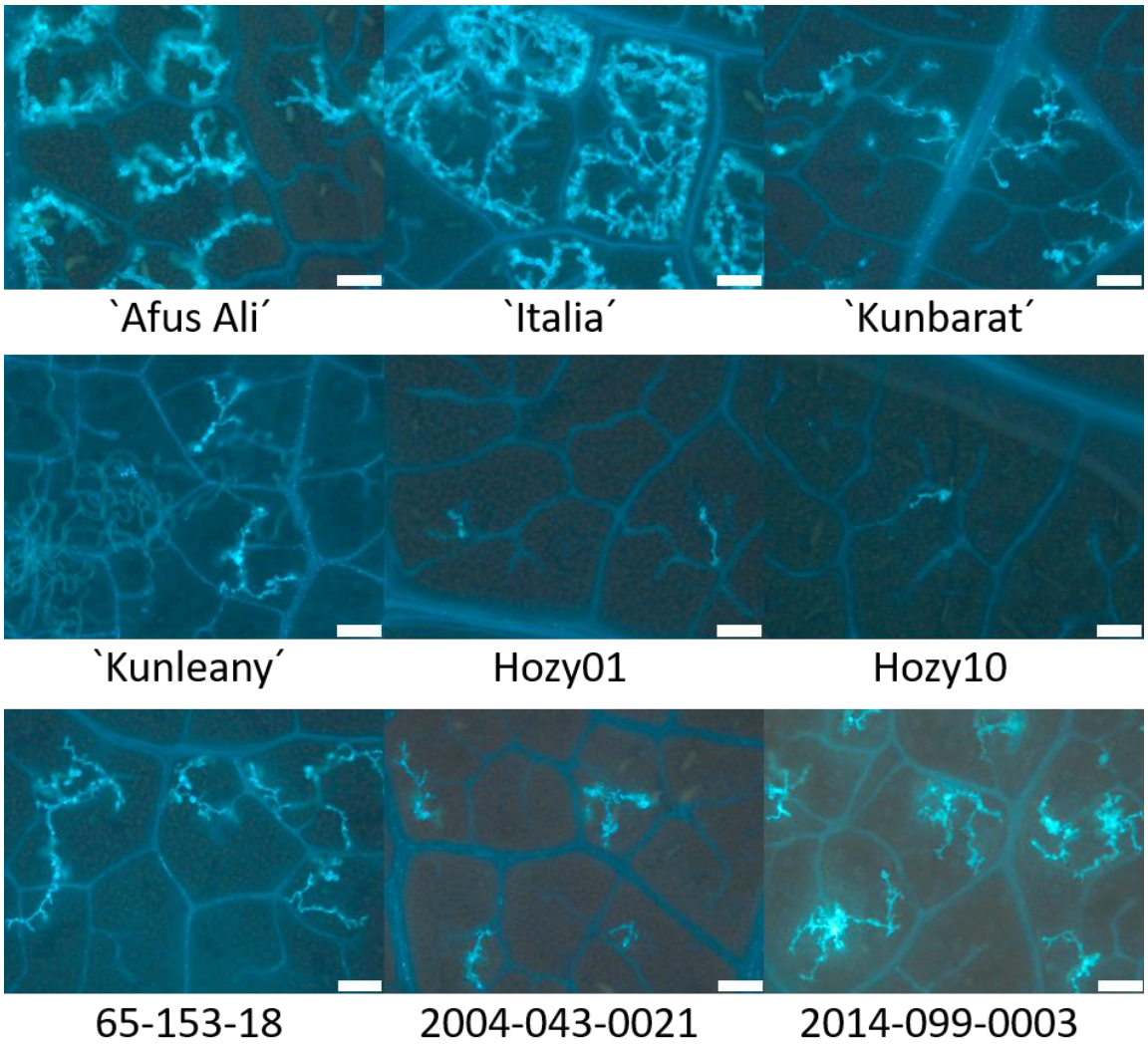


Abbildung 14: Alkalische Anilinblau-Färbung von *P. viticola* in Blattgewebe 72 h nach Inokulation. Gezeigt ist hier das Mzyelwachstum durch *P. viticola* 72 hpi in verschiedenen Genotypen. Der Bildausschnitt ist jeweils 871,00 x 653,25 µm groß. Die Größenreferenz entspricht 100 µm.

Nach 24 h kann bei den homozygoten Genotypen Hozy01 und Hozy10 bereits ein Unterschied dokumentiert werden: es sind weniger Zoosporen zu finden, als bei den anderen Genotypen. Außerdem ist die Ausbildung des Keimschlauchs vermindert. Bei den anderen Genotypen kann der Keimschlauch deutlich dargestellt werden, teilweise ist bereits nach 48 h das Myzel der anfälligen Sorten `Afus Ali´ und `Italia´ mehrfach verzweigt und nimmt viel Raum ein, während sich bei den *Rpv12*-Trägern `Kunbarat´, `Kunleany´, 65-153-18 und 2014-099-0003 wenig verändert hat. Auf den im *Rpv12*-Locus homozygoten Genotypen Hozy01 und Hozy10 ist weiterhin kaum etwas zu erkennen.

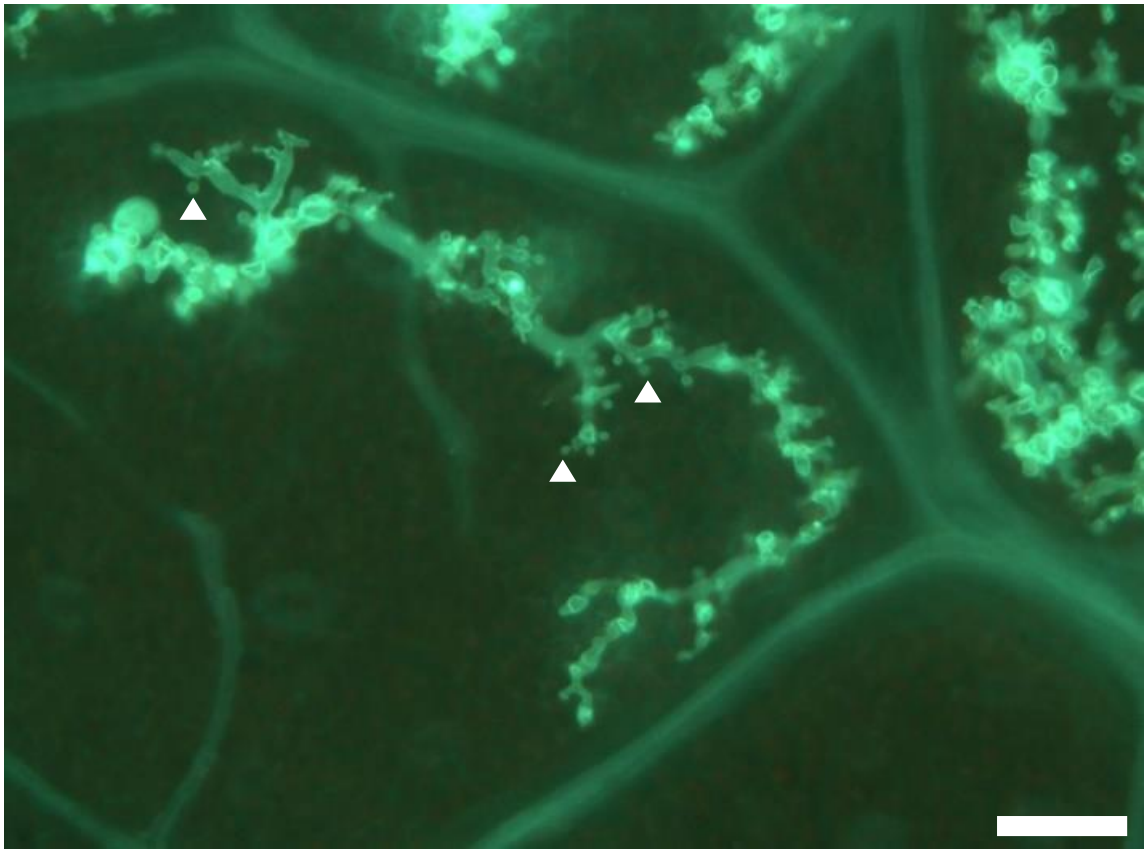


Abbildung 15: Alkalische Anilinblau-Färbung von *P. viticola* in Blattgewebe des Genotyps 2014-099-0003 72 h nach Inokulation. Gezeigt ist hier das Mzyelwachstum durch *P. viticola* 72 hpi im Genotypen 2014-099-0003. Es zeigt sich eine starke Ausprägung von Haustorien durch *P. viticola,* diese sind mit weißen Pfeilspitzen markiert. Der Bildausschnitt ist jeweils 871,00 x 653,25 µm groß. Die Größenreferenz entspricht 100 µm.

Auffallend ist, dass bei Genotypen mit heterozygotem *Rpv12*-Locus häufig eine vermehrte Ausprägung von Haustorien zu beobachten war. Stellvertretend ist in Abbildung 15 eine Aufnahme des Genotyps 2014-099-0003 72 hpi aufgeführt. Bei 72 hpi und auch 7 dpi (engl. *days post infection*) ist zu erkennen, dass bei Genotypen mit *Rpv12*-Locus bzw. auch mit *Rpv1* und *Rpv3.1* bei 2004-043-0021, die Interkostalfelder

nicht ausgefüllt werden und die Hyphen deutlich dünner sind, als es bei den Kontrollgenotypen `Afus Ali´ und `Italia´ der Fall ist. Sporangiophoren werden jedoch, mit Ausnahme der homozygoten Genotypen, immer ausgebildet, wenn auch zumeist in deutlich verminderter Zahl.

3.2.4 Berechnung des Myzelwachstums verschiedener Genotypen

Um die unterschiedliche Ausprägung des Myzelwachstums unter dem Einfluss verschiedener Resistenzloci und Resistenzloci-Kombinationen zu analysieren, wurden pro Genotyp von drei Pflanzen jeweils ein Blatt ausgewählt (also insgesamt drei Blätter pro Genotyp), aus welchen jeweils 3 Blattscheiben ausgestanzt und inokuliert wurden. Nach 72 hpi wurden die Blattscheiben in 1 N KOH eingelegt und nach gründlicher Entfärbung mit Anilinblau-Lösung versetzt (2.3.2). Anschließend wurden von jeder Blattscheibe (mit drei Ausnahmen) fünf Bilder mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Bilder wurden zur Auswertung mittels Fiji (ImageJ-win64, Schindelin *et al*., 2012) entsprechend der Beschreibung in 2.3.11 bearbeitet und analysiert. Die Gesamtpixelzahl der Aufnahmen beträgt 4.915.200. Basierend auf diesem Wert wurde der prozentuale Anteil des Myzels in der Aufnahme ermittelt. Die entsprechende Werte-Tabelle findet sich im Anhang (0).

Zur statistischen Analyse der Daten wurde die Software R und R-Studio verwendet (R Core Team, 2020; https://www.R-project.org/). Zunächst wurden die Datenreihen mittels Shapiro-Test auf die Normalverteilung untersucht und gegebenenfalls, bei einem p-Wert kleiner 0,05, mittels log/sqrt transformiert (bei linksverschiebung erfolgte log, bei rechtsverschiebung sqrt). Dabei erfolgte die Transformation von jedem Genotyp zusammen mit der Rebsorte `Italia´, welche als anfällige Referenzsorte diente. Die Genotypen `Afus Ali´ und `Kunleany´ mussten als „nicht-normalverteilt“ bewertet werden. `Afus Ali´ ist eine *V. vinifera*-Rebsorte und entsprechend anfällig für *P. viticola*. Bei diesem Genotyp konnte eine Normalverteilung durch Auslassung einer Blattscheibe hergestellt werden, bei `Kunleany´ war dies nicht möglich. Der entsprechende Boxplot mit korrigiertem `Afus Ali´ Datensatz ist in Abbildung 16 gezeigt.

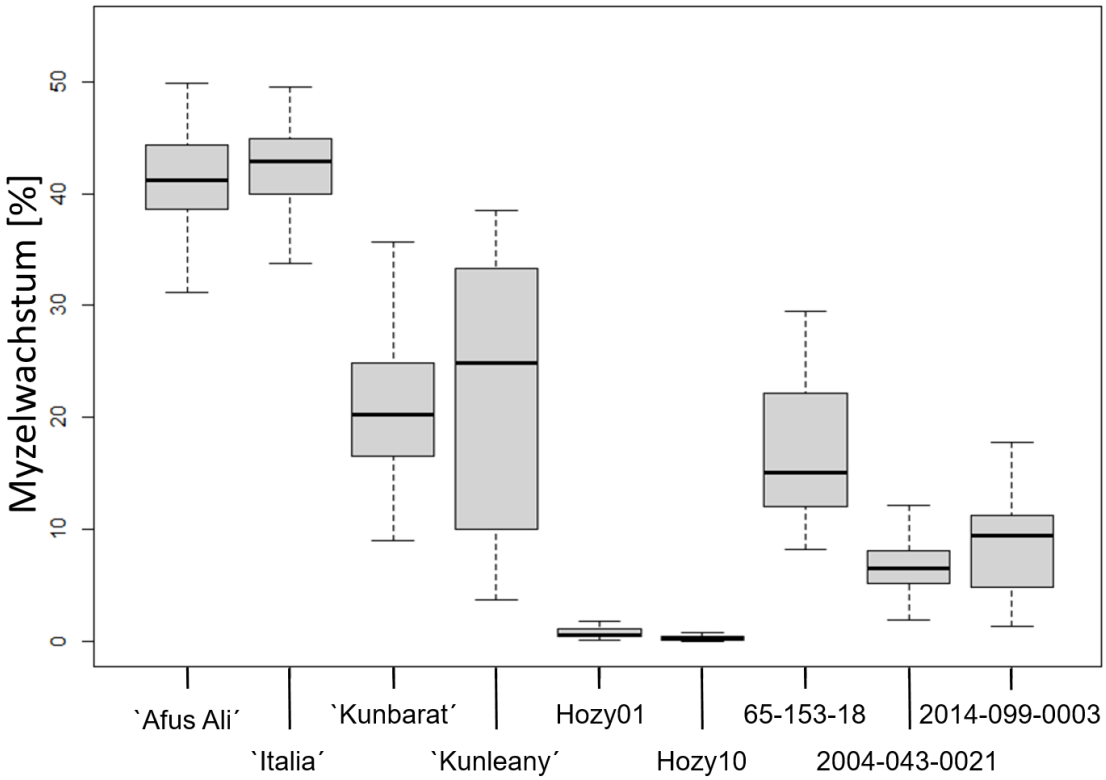


Abbildung 16: Vergleich des Myzelwachstums verschiedener Resistenzträger nach Korrektur. Gezeigt ist hier die grafische Darstellung der Myzelwachstums-Berechnung nach Korrektur der Daten des Genotyps `Afus Ali´. Zur Datenerhebung wurde mittels Fiji das Myzelwachstum von *P. viticola* 72 hpi ausgewertet. Das Myzelwachstum auf allen Genotypen, mit Ausnahme von `Afus Ali´ ist in Bezug auf `Italia´ signifikant unterschiedlich. Als anfällige Referenzen dienten `Afus Ali´ und `Italia´. `Kunbarat´ und 65-153-18 tragen jeweils *Rpv12* und *Rcg1*, `Kunleany´ trägt den *Rpv12*-Locus heterozygot, während Hozy01 den *Rpv12*-Locus homozygot trägt. Hozy10 trägt sowohl *Rpv3.1* als auch *Rpv12* homozygot. 2004-043-0021 trägt *Run1*/*Rpv1*, *Rpv3.1*, *Ren3* und *Ren9*, 2014-099-0003 verfügt über die Loci *Rpv12*, *Rcg1*, *Ren3* und *Ren9*.

Die Signifikanz wurde in Bezug auf die anfällige Rebsorte `Italia´ mittels Welch's t-Test ermittelt Dabei zeigte sich, dass im Hinblick auf `Italia´ alle Genotypen einen signifikanten Unterschied im Myzelwachstum aufweisen. Die Genotypen `Kunbarat´ (*Rcg1*, *Rpv12*) und 65-153-18 (*Rcg1*, *Rpv12*) ähneln sich weitgehend. Deutlich weniger Myzel ist jedoch bei den Genotypen 2004-043-0021 (*Rpv1*, *Rpv3.1*, *Run1*, *Ren3*, *Ren9*) und 2014-099-0003 (*Rpv12*, *Rcg1*, *Ren3*, *Ren9*) entwickelt. Das geringste Myzelwachstum konnte jedoch bei den homozygoten Genotypen Hozy01 (*Rpv12* +/+) und Hozy10 (*Rpv3.1* +/+, *Rpv12* +/+) festgestellt werden.

3.2.5 Verstärkung der Resistenz durch Homozygotie von *Rpv12*

Es steht schon lange in der Diskussion, ob die Homozygotie eines Resistenzlocus einen Einfluss auf die Ausprägung der Resistenz hat. Diese Vermutung verstärkte sich durch

mikroskopische Untersuchungen mittels alkalischer Anilinblau-Färbung (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 17). Um dies im Hinblick auf *Rpv12* zu untersuchen, wurden zwei Genotypen aus der Züchtung verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Rudolf Eibach und Dr. Oliver Trapp). In den mikroskopischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Resistenz der Genotypen Hozy01 (2012-003-0001) und Hozy10 (2012-003-0010) gegenüber *P. viticola* stark ausgeprägt ist. Für einen Vergleich der Resistenzausprägung bei Homozygotie und bei der Kombination mehrerer Loci wurden die Genotypen auf verschiedene Resistenzloci untersucht. Dies erfolgte primär auf die Loci *Rpv3 (vgl.* Tabelle 20*)*, *Rpv10* und *Rpv12*, da hier die Anwendung Locus-flankierender Marker am besten erprobt ist. Davon ausgehend konnte gezeigt werden, dass Hozy01 über keinen *Rpv3*-locus verfügt, Hozy10 trägt jedoch den Resistenzlocus *Rpv3.1* homozygot (amerikanischen Ursprungs, aus `Regent´) zusätzlich zum homozygot vorliegenden *Rpv12*-Locus. Auf den als Referenzsorten mitgeführten Genotypen befinden sich zudem weitere Resistenzloci, die eine Resistenz gegen *Erysiphe necator* (*Ren*) vermitteln. Hierfür wurden die Rebsorten `Solaris´ (*Rpv3.3/Rpv10/Ren3/Ren9*), `Regent´ (*Rpv3.1/Ren3/Ren9*), `Merzling´ (*Rpv3.3/Ren3/Ren9*), als Referenz mitgeführt, ebenso wie der maternale Genotyp der homozygoten Genotypen IRZ0973.

Tabelle 20: Untersuchung der Präsenz von *Rpv3* in den *Rpv12*-homozygoten Genotypen Hozy01 und Hozy10. Gezeigt sind die Markerdaten der Genotypen Hozy01 und Hozy10 in Referenz zu verschiedenen *Rpv3*-tragenden Genotypen. Angegeben ist der *Rpv3* Locus mit seinen Varianten 3.1, 3.2 und 3.3 und die jeweils mit der Resistenz assoziierte Allelgröße. Einige Marker sind doppelt aufgeführt, da sie je nach Allelgröße unterschiedliche Loci beschreiben.

Marker	Hozy01	Hozy10	IRZ973	Merzling	Regent	Solaris	Locus	Allelgröße [bp]
GF18-06	386	**388**	386/**388**		382/**388**	374/**388**	*Rpv3.1*	388
UDV-737	296	**282**	**282**/296	274/288	**282**/298	274/308	*Rpv3.1*	282
GF18-06	386	388	386/388		382/388	374/388	*Rpv3.2*	407
UDV-737	296	282	282/296	274/288	282/298	274/308	*Rpv3.2*	302
GF18-01	280	276	276/280		276/280	268/**278**	*Rpv3.3*	278
GF18-04	248	230	230/248	**216**/228	224/230	**216**/222	*Rpv3.3*	216
UDV-737	296	282	282/296	**274**/288	282/298	**274**/308	*Rpv3.3*	273

Um die homozygoten Genotypen in Vergleich zur Elterpflanze IRZ0973 (*Rpv3.1* und *Rpv12*) mikroskopisch zu vergleichen, wurde eine alkalische Anilinblau-Färbung durchgeführt. Dabei wurde das Blattmaterial für Hozy01 und Hozy10 aus dem Gewächshaus entnommen, während die Blattproben der anderen Genotypen aus dem

Freiland stammten (Abbildung 17). Dabei ist zu sehen, dass der parentale Genotyp eine ähnlich starke Resistenz aufweist wie die Genotypen Hozy01 und Hozy10. Dass die Auswirkung der Homozygotie jedoch nicht vom parentalen Genotypen abhängt, konnte anhand `Kunbarat´-Selbstungslinien gezeigt werden (3.3, vgl. Abbildung 23, Tabelle 23).

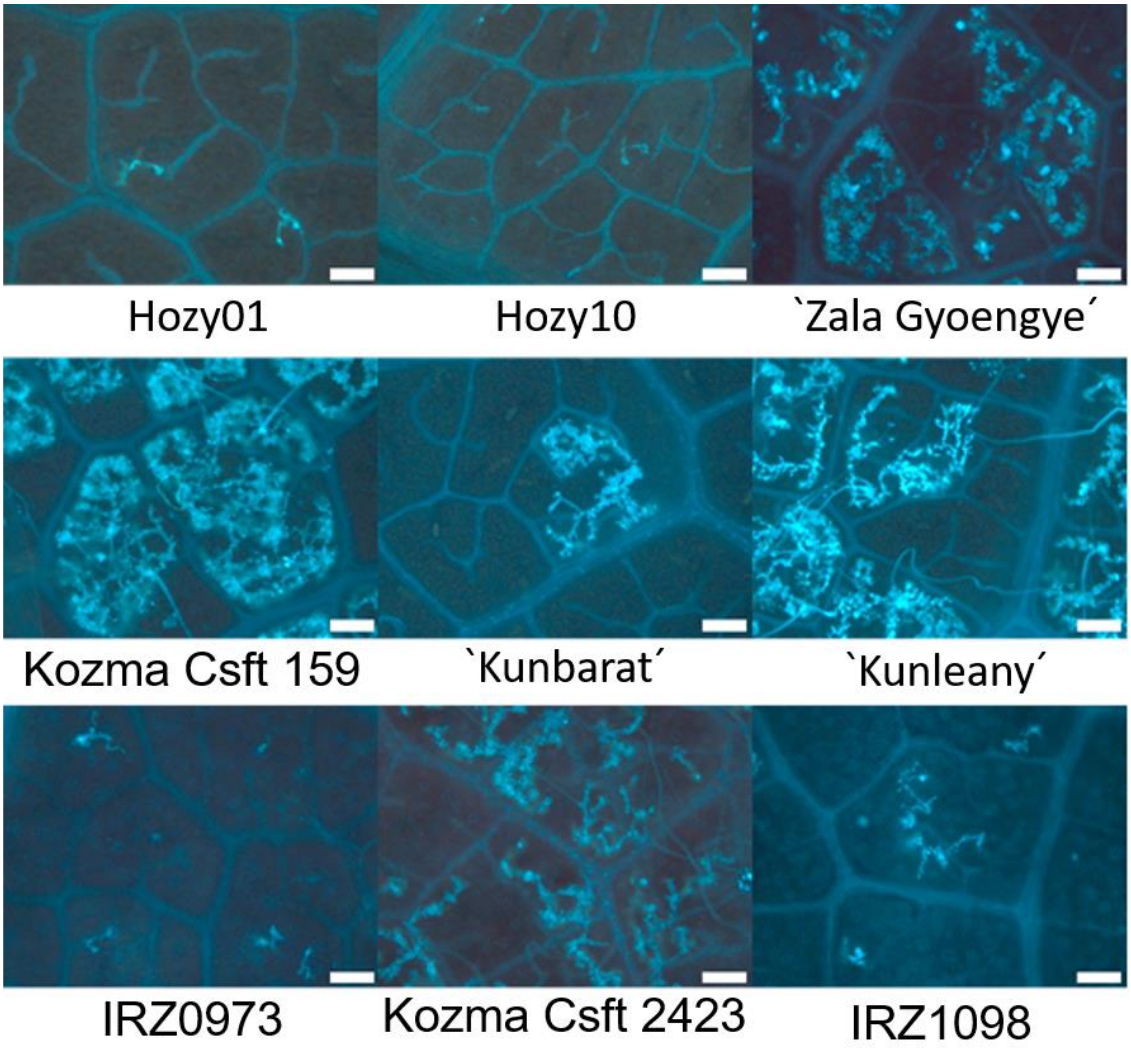


Abbildung 17: Alkalische Anilinblau-Färbung 72 h nach Inokulation. Bei den Abbildungen der Genotypen Hozy01, Hozy10 handelt es sich um inokuliertes Gewächshausmaterial. Die weiteren Genotypen wurden dem Freiland entnommen. Der Bildausschnitt ist jeweils 871,00 x 653,25 µm groß. Die Größenreferenz entspricht 100 µm.

Vergleicht man das Myzelwachstum der Genotypen Hozy01 und Hozy10, kann ein Unterschied dokumentiert werden, welcher allerdings nicht signifikant ist. Während das Myzel des Genotyps Hozy01 im Durchschnitt etwa 0,7 % der dokumentierten Bildflächen ausmacht, ist es bei Hozy10 nur 0,4 % (Abbildung 18).

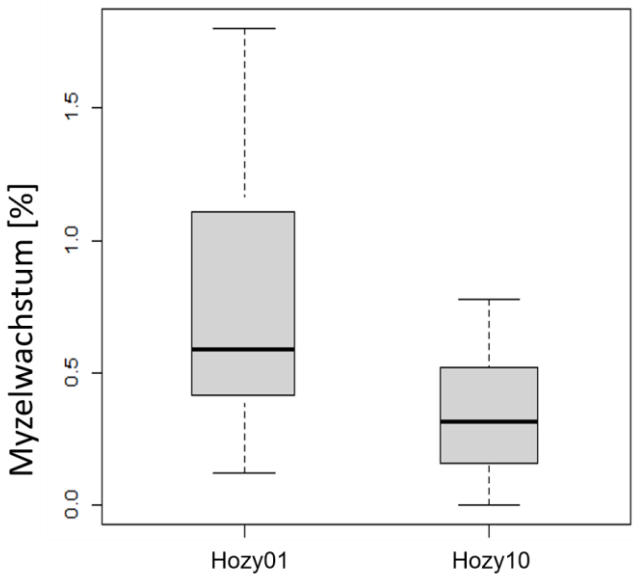


Abbildung 18: Vergleich des Myzelwachstums der homozygoten Resistenzträger Hozy01 und Hozy10. Hozy01 ist homozygot im *Rpv12*-Locus. Hozy10 ist sowohl im *Rpv3.1* als auch im *Rpv12*-Locus homozygot.

3.2.6 Reaktive Sauerstoffspezies in resistenten Genotypen

Da sich die Resistenz *Rpv12*-tragender Genotypen durch eine rasche Nekrosenbildung auszeichnet, wurden zwei Verfahren zur Dokumentation reaktiver Sauerstoffspezies durchgeführt. Zum einen wurde eine Nitrotetrazolium-Blau-Chlorid-Färbung (NBT, 2.3.5) durchgeführt. NBT färbt Gewebe bei $O_2^{\bullet-}$-Vorkommen dunkelblau. Durch H_2O_2 wird NBT jedoch reduziert und zeigt sich als braune Färbung (Wohlrab & Fuchs, 1967; Baehner *et al*., 1976; Kumar *et al*., 2014). Zum anderen wurden Diaminobenzidin-Färbungen (DAB) durchgeführt. Hierbei wird DAB durch H_2O_2 oxidiert und zeigt sich als brauner Farbstoff (Thordal-Christensen *et al*., 1997). Bereits 24 hpi können bei allen Resistenz-tragenden Genotypen braune Läsionen dokumentiert werden. Mit zunehmender Zeit nimmt auch die Fläche der Läsionen zu. Bei beiden Färbungen konnte nur die Bildung von H_2O_2 dokumentiert werden. Anhand der blauen Wundränder der gefärbten Blattscheiben, kann jedoch von einer erfolgreichen Färbung ausgegangen werden. Die Färbungen wurden jeweils zwei Mal durchgeführt und drei Proben pro Genotyp und Durchlauf analysiert.

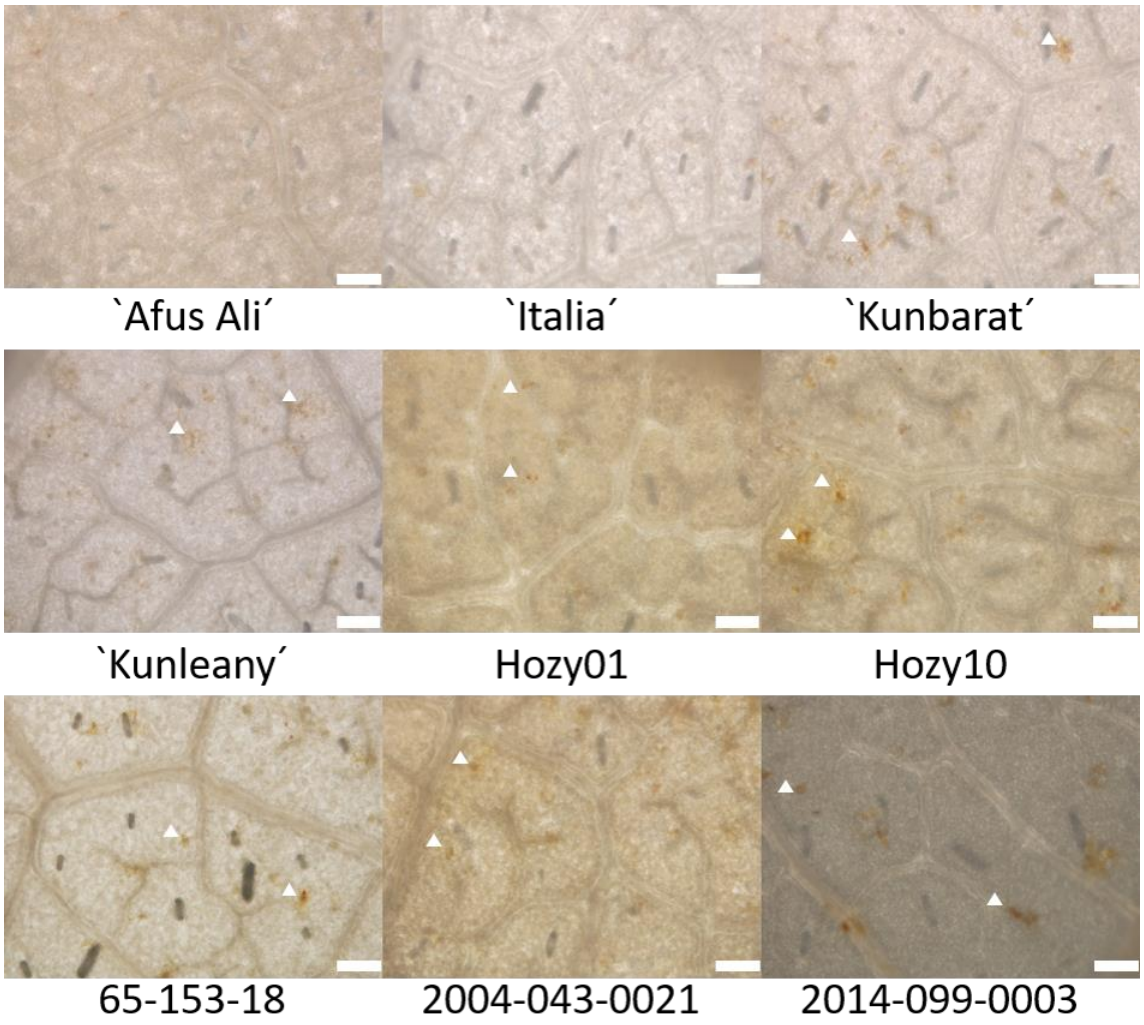


Abbildung 19: Färbung mit Diaminobenzidin 24 h nach Inokulation. Deutlich zu sehen sind braune Läsionen bei den resistenztragenden Genotypen `Kunbarat´, `Kunleany´, Hozy01, Hozy10, 65-153-18, 2004-043-0021, 2014-099-0003. Einige Läsionen wurden mittels weißer Pfeilspitzen markiert. Der Bildausschnitt ist jeweils 871,00 x 653,25 µm groß. Die Größenreferenz entspricht 100 µm.

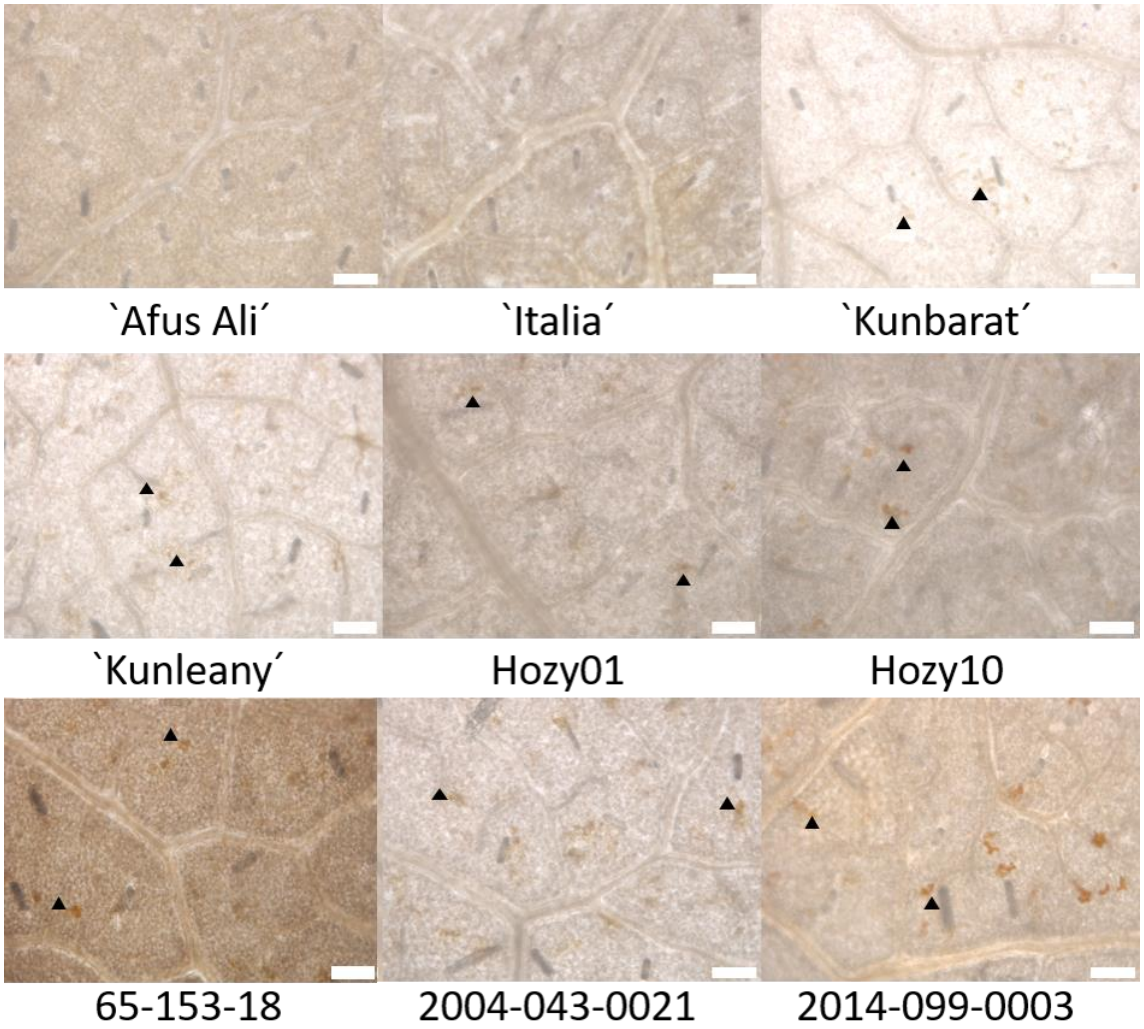


Abbildung 20: Färbung mit Nitrotetrazoliumblau-Chlorid 24 h nach Inokulation. Deutlich zu sehen sind braune Läsionen bei den resistenztragenden Genotypen `Kunbarat´, `Kunleany´, Hozy01, Hozy10, 65-153-18, 2004-043-0021, 2014-099-0003. Einige Läsionen wurden mittels schwarzer Pfeilspitzen markiert. Der Bildausschnitt ist jeweils 871,00 x 653,25 µm groß. Die Größenreferenz entspricht 100 µm.

3.2.7 Kalloseproduktion in resistenten Genotypen

Yu *et al.* beschrieben 2012, dass resistente Wildarten (*M. rotundifolia* `Carlos´, *V. pseudoreticulata* 1057/1058, *V. amurensis* `Shuanghong´, *V. amurensis* `Zuoshanyi´ bei Infektion durch *P. viticola* Kallose bilden. Auch bei der Rebsorte `Solaris´, welche von der Wildart *V. amurensis* sowie der Rebsorte `Merzling´ abstammt und die Resistenzloci *Rpv3.3* und *Rpv10* trägt, wurde durch Gindro *et al.* 2003 Kallosebildung im Rahmen eines Abwehrmechanismus beschrieben.

Um diesen Mechanismus zu bestätigen oder auszuschließen, wurde zunächst eine Anilinblau-Färbung entsprechend 2.3.10 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung

21 gezeigt. Es konnte keine Relation zwischen Kallosebildung und Resistenzeigenschaften der Rebsorten dokumentiert werden.

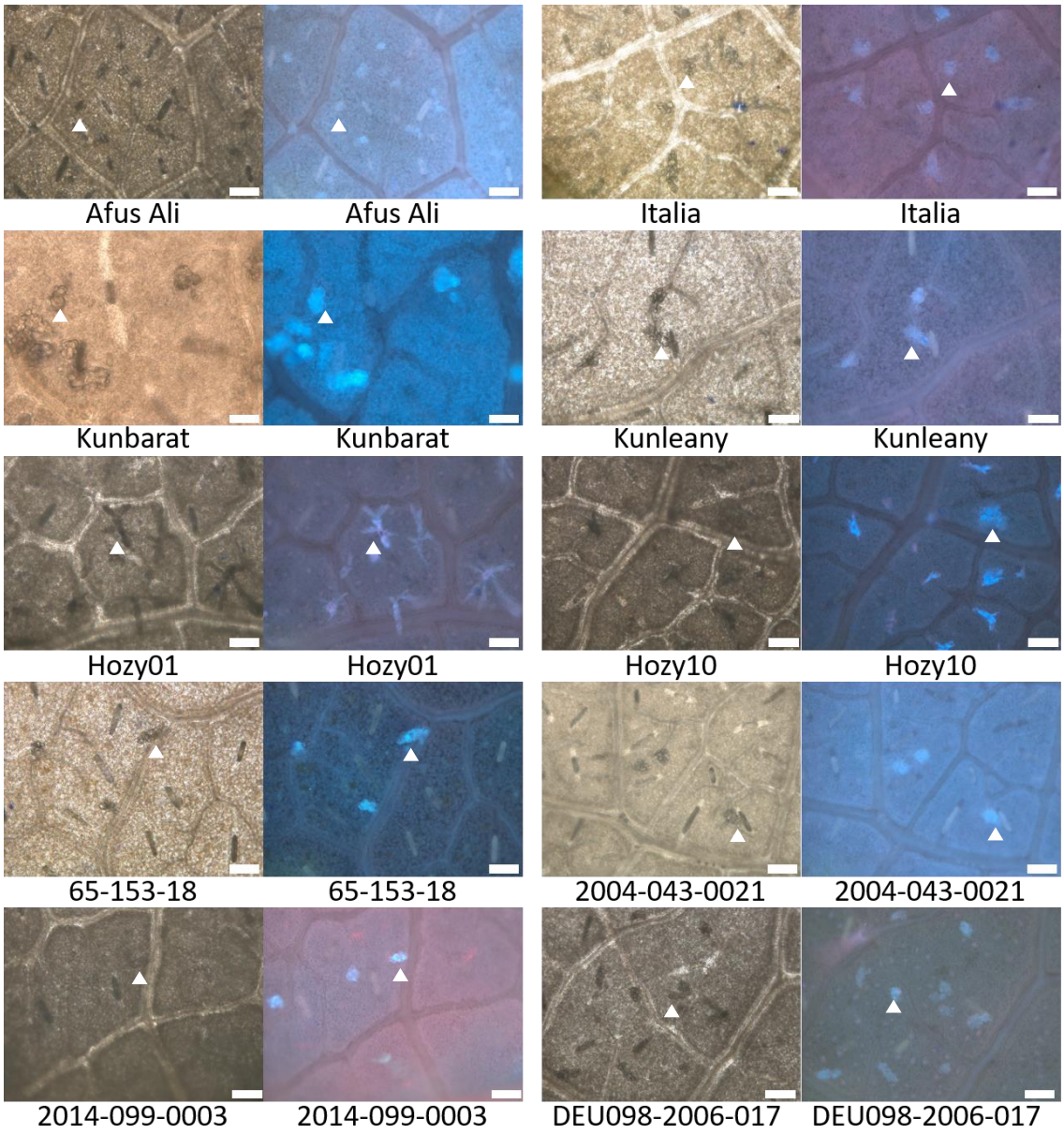


Abbildung 21: Kallosefärbung mittels Anilinblaufärbung 24 h nach Inokulation mit *Plasmopara viticola*. Der Bildausschnitt ist jeweils 871,00 x 653,25 µm groß. Die Größenreferenz entspricht 100 µm. Kalloseakkumulationenn sind mit weißen Pfeilspitzen markiert.

Um sicherzustellen, dass es sich nicht um einen methodischen Fehler handelt, wurde außerdem eine Resorcin-Färbung entsprechend 2.3.9 durchgeführt. Doch auch hier konnte bei allen Genotypen Kallose festgestellt werden und somit keine Korrelation zwischen *Rpv12*-Locus und Kalloseakkumulation dokumentiert werden. Die Ergebnisse der Resorcin-Färbung sind in Abbildung 22 gezeigt.

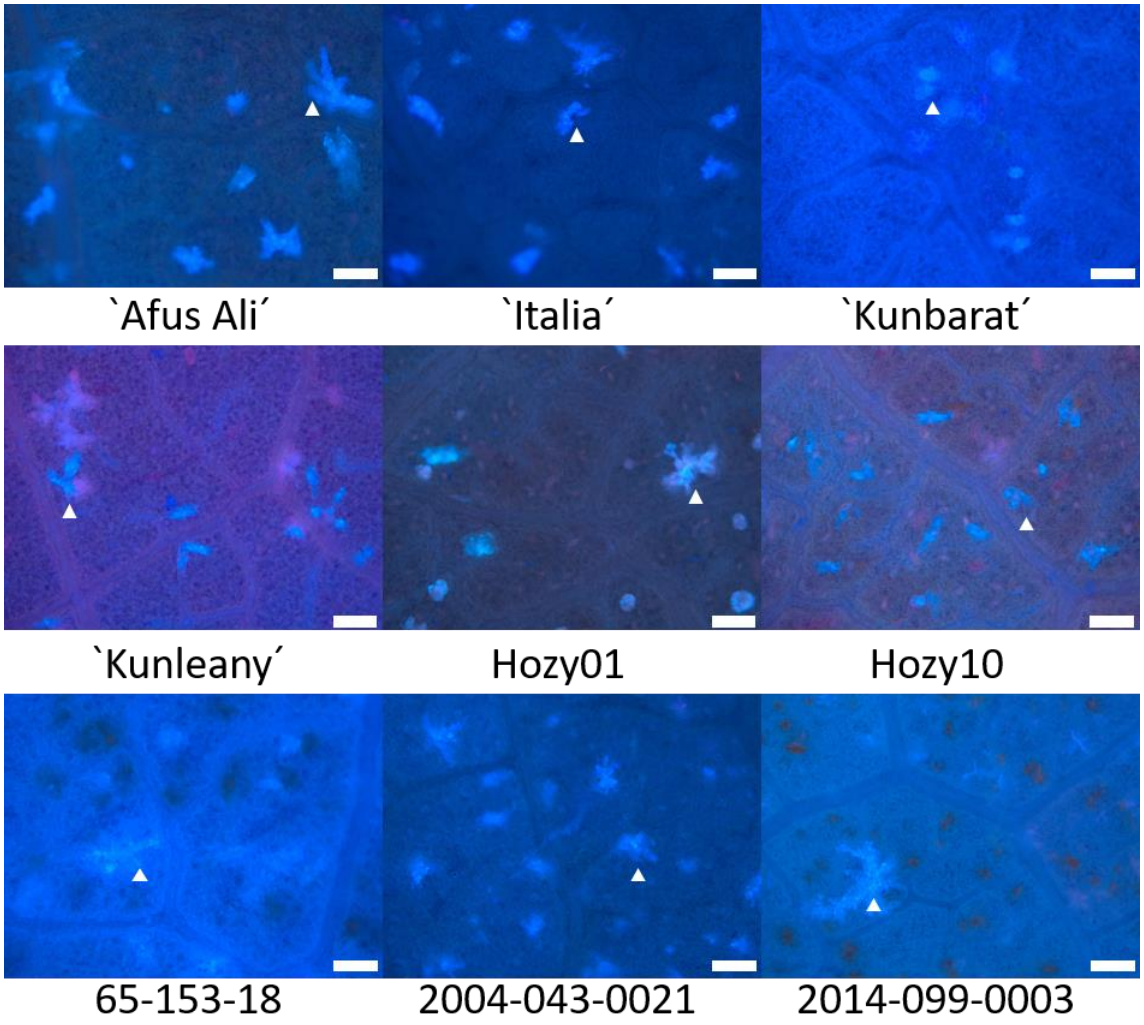


Abbildung 22: Resorcinfärbung zur Detektion von Kallose 24 h nach Inokulation mit *Plasmopara viticola*. Der Bildausschnitt ist jeweils 871,00 x 653,25 µm groß. Die Größenreferenz entspricht 100 µm. Kalloseakkumulationen sind mit weißen Pfeilspitzen markiert.

3.3 Cleaved Amplified Polymorphic Sequences-Analyse

Im Verlauf der Arbeiten am *Rpv12*-Locus wurde durch einen persönlichen Kontakt eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Ian Dry geschlossen (*Commonwealth Scientific and Research Organisation,* CSIRO), welche einen Arbeitsbericht veröffentlichte, in dessen Rahmen Arbeiten zu *Rpv12*-tragenden Genotypen erfolgten (Dry *et al.*, 2017). Die Arbeitsgruppe von Dr. Ian Dry des CSIRO hat in Zusammenarbeit mit Dr. Ling Yin (Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, China) einen *Rpv12*-Träger sequenziert und annotiert. Im Rahmen dieser Kooperation wurden sieben Sequenzen für *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* (CAPS) – Marker zur Verfügung gestellt. Die übermittelten CAPS-Marker (vgl. 2.1.3.5) wurden auf etwa 200 *Rpv12*-Trägern angewendet und in Korrelation zu makroskopisch bewerteten Blattscheiben und mikroskopischen Aufnahmen des Myzelwachstums gesetzt. Für die CAPS-Analyse wurden verschiedene Verfahren verwendet, die unter 2.2.2.3 und 2.2.2.5 näher beschrieben sind. Da die Restriktion der PCR-Fragmente sich großteils nicht ausreichend auswerten ließ, wurden die Ergebnisse mit der Amplifikation einer SNP-spezifischen Polymerase verglichen.

Bei den 150 pyramidisierten Genotypen aus der Züchtung konnte zunächst keine Korrelation zur Resistenz detektiert werden. Daher wurden von verschiedenen *Rpv12*-Trägern (`Kunbarat´, `Kunleany´, 2014-099-0003, 65-153-18) Amplikon-DNA-Sequenzierungen, nach Klonierung der Amplifikate in pJet1.2/blunt, durchgeführt (vgl. 2.2.2.2, 2.2.3.4, 2.2.3). Von den sieben zur Verfügung gestellten CAPS-Markern konnten so vier SNPs auf den zwei Haplotypen verschiedener *Rpv12*-Träger identifiziert werden. Die anderen drei SNPs waren nicht segregierend. Die segregierenden SNPs wurden als SNP_976, SNP_983, SNP_987, SNP_988 bezeichnet (vgl.Tabelle 21).

Tabelle 21: Übersicht der möglicherweise Resistenz-assoziierten SNPs im *Rpv12*-Locus. Aufgeführt sind die SNP-Bezeichnungen und die Zuordnung der SNPs zum resistenten bzw. anfälligen Allel.

	Resistenz-Allel	Anfälligkeits-Allel
SNP_976	A	T
SNP_983	C	G
SNP_987	A	G
SNP_988	A	T

Hingegen konnten basierend auf einer Inzuchtlinie von `Kunbarat´ charakteristische Genotypen mit den CAPS-Markern in Zusammenhang gebracht werden. Hierfür wurden zunächst Markeranalysen mit *Rpv12*-assoziierten Markern durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: SSR-Markeranalyse der `Kunbarat´-Inzuchtlinien. Verwendet wurden SSR-Marker die mit *Rpv12* assoziiert sind. Aufgeführt sind die Namen der Genotypen (dabei steht KbOP für „*Kunbarat open Pollination*“) die Marker-Bezeichnungen, die Position im Genom (basierend auf dem Referenzgenom PN40024 12X.v2, Jaillon *et al.*, 2007; Canaguier *et al.*, 2017) und die Resistenz-assoziierte Fragmentgröße [bp]. Genotypen mit *Rpv12*-Locus sind durch Fettschrift markiert.

	UDV-350	**UDV-343**	**UDV-340**	**UDV-360**	**UDV-370**	**VMC2H12**	**GF14-52**
	Chr.14: 8963923	**Chr.14: 9012000**	**Chr.14: 9145665**	**Chr.14: 9910488**	**Chr.14: 10110182**	**Chr.14: 10304031**	**Chr.14: 13215023**
Rpv12	**310**	**159**	**179**	**208**	**198**	**100**	**377**
KbOP01	308 / 310	159 / 191	177 / 179	204 / 208	196 / 198	100 / 106	367 / 377
KbOP03	310 / 310	159 / 159	179 / 179	208 / 208	196 / 198	100 / 100	367 / 377
KbOP04	308 / 308	191 / 191	177 / 177	204 / 204	196 / 196	106 / 106	367 / 367
KbOP05	308 / 310	159 / 191	177 / 179	204 / 208	196 / 198	100 / 106	367 / 377
KbOP07	310 / 310	159 / 159	179 / 179	208 / 208	198 / 198	100 / 100	377 / 377
KbOP09	310 / 310	159 / 159	179 / 179	208 / 208	198 / 198	100 / 100	377 / 377
KbOP10	308 / 310	159 / 191	177 / 179	204 / 208	196 / 198	106 / 106	367 / 377
KbOP13	310 / 310	159 / 159	179 / 179	208 / 208	198 / 198	100 / 100	377 / 377
KbOP14	308 / 310	159 / 191	177 / 179	204 / 208	196 / 198	100 / 106	367 / 377
KbOP15	308 / 310	159 / 191	177 / 179	204 / 208	196 / 198	100 / 106	367 / 377
KbOP16	308 / 308	191 / 191	177 / 177	204 / 204	196 / 196	106 / 106	367 / 367
KbOP17	308 / 308	191 / 191	177 / 177	204 / 204	196 / 196	106 / 106	367 / 367
KbOP18	310 / 310	159 / 159	179 / 179	208 / 208	198 / 198	100 / 100	377 / 377
KbOP19	308 / 310	159 / 191	177 / 179	204 / 208	196 / 198	100 / 106	367 / 377
KbOP20	308 / 310	159 / 191	177 / 179	204 / 208	198 / 198	100 / 106	367 / 377
KbOP21	310 / 310	159 / 159	179 / 179	208 / 208	198 / 198	100 / 100	377 / 377
KbOP22	308 / 308	191 / 191	177 / 177	204 / 204	196 / 196	106 / 106	367 / 367
KbOP23	308 / 310	159 / 191	177 / 179	204 / 208	196 / 198	100 / 106	367 / 377
KbOP24	308 / 310	159 / 191	179 / 179	204 / 208	196 / 198	100 / 106	367 / 377
KbOP25	308 / 310	159 / 191	177 / 179	204 / 208	196 / 198	100 / 106	367 / 377
KbOP26	310 / 310	159 / 159	179 / 179	208 / 208	198 / 198	100 / 100	377 / 377
KbOP27	308 / 310	159 / 191	177 / 179	204 / 208	196 / 198	100 / 106	367 / 377
KbOP28	308 / 308	191 / 191	177 / 177	204 / 204	196 / 196	106 / 106	367 / 377
KbOP29	310 / 310	159 / 159	179 / 179	208 / 208	198 / 198	100 / 100	377 / 377
KbOP30	310 / 310	159 / 159	179 / 179	208 / 208	198 / 198	100 / 100	377 / 377
KbOP32	310 / 310	159 / 159	179 / 179	208 / 208	198 / 198	100 / 100	377 / 377
KbOP33	310 / 310	159 / 159	179 / 179	208 / 208	198 / 198	100 / 100	377 / 377
KbOP34	308 / 310	159 / 191	177 / 179	204 / 208	196 / 198	100 / 106	367 / 377
KbOP35	308 / 310	159 / 191	177 / 179	204 / 208	196 / 198	100 / 106	367 / 377

	UDV-350	UDV-343	UDV-340	UDV-360	UDV-370	VMC2H12	GF14-52
	Chr.14: 8963923	Chr.14: 9012000	Chr.14: 9145665	Chr.14: 9910488	Chr.14: 10110182	Chr.14: 10304031	Chr.14: 13215023
Rpv12	**310**	**159**	**179**	**208**	**198**	**100**	**377**
Kunbarat	308 / 310	159 / 191	177 / 179	204 / 208	196 / 198	100 / 106	367 / 377
Kunleany	308 / 310	159 / 191	179 / 179	208 / 210	194 / 198	94 / 100	371 / 377
65-153-18	310 / 310	159 / 197	179 / 197	202 / 208	196 / 198	100 / 112	367 / 377

Anschließend wurden zwei Blattscheibentests durchgeführt, welche nach sechs bzw. sieben Tagen ausgewertet wurden. Pro Genotyp wurden jeweils insgesamt sechs Blattscheiben aus zwei Blättern beprobt. Anschließend wurden je drei der Blattscheiben aus einem Lauf mittels alkalischer Anilinblau-Färbung hinsichtlich des Myzelwachstums begutachtet (8 dpi). Dabei zeigte sich, dass die mangelnde Ausprägung von Sporangiophoren nicht zwangsläufig mit einem geringen Myzelwachstum einhergeht. Die mikroskopischen Aufnahmen des Myzelwachstums sind in Abbildung 23 gezeigt. Dabei zeigt sich ein starkes Myzelwachstum bei den Genotypen KbOP_01 / 03 / 04 / 05 / 09 / 13 / 14 / 15 / 16 / 17 / 22 / 23 / 24 / 27 / 28 / 31 / 33 / 34 und 35. Ein deutlich verringertes Myzelwachstum konnte bei den Genotypen KbOP_07 / 10 / 18 / 19 / 20 / 21 / 25 / 26 / 29 / 30 beobachtet werden. Bei Nutzung der Marker UDV-350, UDV-343, UDV-340, UDV-360, UDV-370, VMC2H12 und GF14-52 zeigte sich, dass die Genotypen KbOP_04 / 16 / 17 / 22 / 28 nicht über den *Rpv12*-Locus verfügen. Diese zeigten sich auch bei den Blattscheibentests als anfällig. Die weiteren beprobten Genotypen sind jedoch *Rpv12*-Träger. Davon sind KbOP_03 / 07 / 09 / 13 / 18 / 20 / 21 / 26 / 29 / 30 / 33 im *Rpv12*-Locus homozygot. Außerdem ist KbOP_20 im Marker UDV-370 homozygot, während das Markerprofil bei den anderen Markern heterozygot ist. Daraus zeigt sich, dass von 11 Genotypen, die im *Rpv12*-Locus homozygot sind, sieben ein stark vermindertes Myzelwachstum haben. Bei den Genotypen KbOP_03 und KbOP_09 konnten außerdem makroskopisch kaum Sporangiophoren dokumentiert werden.

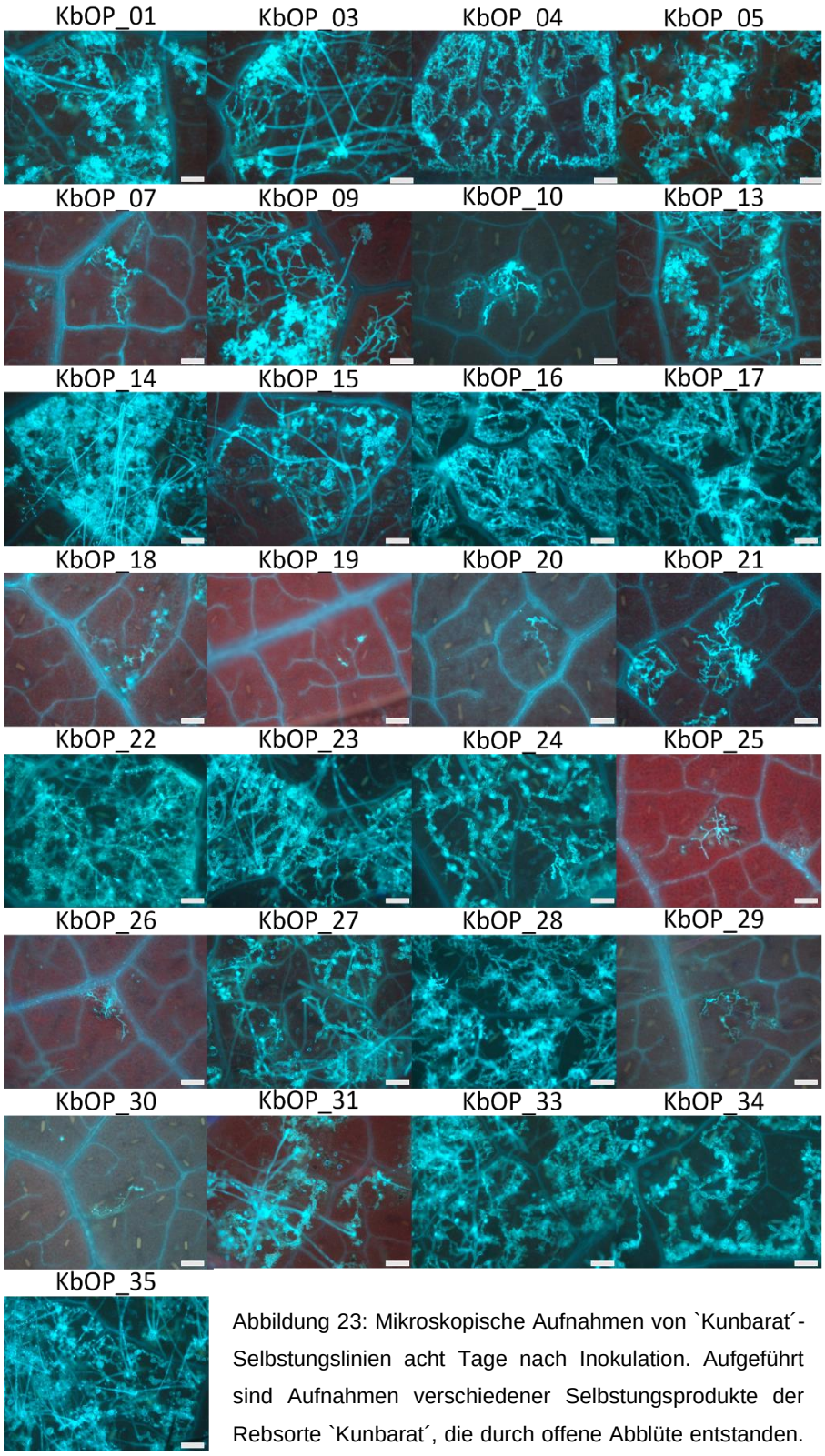


Abbildung 23: Mikroskopische Aufnahmen von `Kunbarat´-Selbstungslinien acht Tage nach Inokulation. Aufgeführt sind Aufnahmen verschiedener Selbstungsprodukte der Rebsorte `Kunbarat´, die durch offene Abblüte entstanden. Die Färbung erfolgte mittels alkalischer Anilinblau-Färbung. Der Bildausschnitt ist jeweils 871,00 x 653,25 µm groß. Der Referenzbalken entspricht 100 µm.

Im Anschluss wurden die verbliebenen vier möglicherweise Resistenz-assoziierten CAPS-Marker auf den `Kunbarat´-Inzuchtlinien angewendet und in Relation zu den Daten der Blattscheibentests und Mikroskopie gesetzt (vgl. Tabelle 23). Beim Myzelwachstum ist zu beachten, dass bei einem stark vorhandenen Myzelwachstum grundsätzlich eine 9 gegeben wurde, da eine Differenzierung des Myzelwachstums bei der gegebenen Ausprägung, aufgrund des späten Zeitpunkts der Untersuchung (8 dpi), schwierig zu bewerten ist.

Tabelle 23: Cleaved Amplified Polymorphic Sequences-Analyse einer `Kunbarat´-Selbstung. Aufgeführt sind hier die SNPs die mittels SNP-Polymerase identifiziert wurden. Aufgeführt sind die CAPS 976, 983, 987, 988 und ihre Zuordnung entsprechend CSIRO zum resistenten oder anfälligen Haplotyp. Weiterhin aufgeführt sind OIV-Bewertungen (OIV 452 und 452-1 franz. *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*) von zwei unabhängigen Blattscheibentests, wobei hier, im Gegensatz zur OIV 1 für wenig Bewuchs/hohe Resistenz durch *Plasmopara viticola* und 9 für starken Bewuchs/keine Resistenz steht. k steht für Kontamination, HR für Hypersensitive Reaktion. Ebenso bewertet wurde die mikroskopische (Mik.) Analyse des Myzelwachstums.

	976		983		987		988		Blattscheibentest				Myzel
	Res.	Sus.	Res.	Sus.	Res.	Sus.	Res.	Sus.	6 dpi		7 dpi		8 dpi
SNPs	A	T	C	G	A	G	A	T	OIV		OIV		Mik.
KbOP01	A	T	C	G	A	G	A	T	5		6		9
KbOP03	A	T	C	G	A	G	A		2		0		9
KbOP04	-	-	C		A	G		T	k		k		9
KbOP05	A	T	C	G	A	G	A	T	3		2		9
KbOP07	A	T	C	G	A	G	A		0 / k		0		2
KbOP09	A	T	C	G	A	G	A		1		0		9
KbOP10	A	T	C	G	A	G	A	T	0	HR	0	HR	2
KbOP13	A	T	C	G	A	G	A		2		5		5
KbOP14	A	T	C	G	A	G	A	T	3 / k		4		9
KbOP15	A	T	C	G	A	G	A	T	0		4		5
KbOP16	-	-	C		A	G		T	7		4 / k		9
KbOP17	-	-	C	G	A	G		T	9		9		9
KbOP18	A	T	C	G	A	G	A		0		2	HR	1
KbOP19	A	T	C	G	A	G	A	T	0		5		1
KbOP20	A	T	C	G	A	G	A	T	0		2		1
KbOP21	A	T	C	G	A	G	A		0		0		3
KbOP22	-	-	C		A	G	A	T	7		9 / k		9
KbOP23	A	T	C	G	A	G	A	T	5		4		9
KbOP24	A	T	C	G	A	G	A	T	4		1		9
KbOP25	A	T	C	G	A	G	A	T	0		2		1
KbOP26	A	T	C	G	A	G	A	-	0	HR	0		1
KbOP27	-	-	C		A		-	-	3		3		9
KbOP28	-	-	C		A	G	A	T	5 / k		k		9

	976		983		987		988		Blattscheibentest				Myzel
	Res.	Sus.	Res.	Sus.	Res.	Sus.	Res.	Sus.	6 dpi		7 dpi		8 dpi
SNPs	A	T	C	G	A	G	A	T	OIV		OIV		Mik.
KbOP29	A	T	C	G	A	G	A		0		0		1
KbOP30	A	T	C	G	A	G	A		0		0		1
KbOP32	A	T	C	G	A	G	A		2		0		7
KbOP33	A	T	C	G	A	G	-	-	5		5		9
KbOP34	A	T	C	G	A	G	A	T	5	HR	4	HR	5
KbOP35	A	T	C	G	A	G	A	T	4		0		9

Es zeigt sich, dass bei Genotypen die keine Adenin-Base im SNP_988 tragen, das Myzelwachstum und die makroskopisch sichtbare Ausprägung der Sporangiophoren stärker ist, als bei Genotypen, die die Adenin-Base im SNP_988 tragen. Dies konnte mittels Pearson-Korrelation bestätigt werden. Hier konnte für das resistente Allel von SNP_988 eine Korrelation von -0,41 und für das anfällige Allel eine Korrelation von 0,28 bis 0,4 (abhängig vom gewählten Blattscheibentest) zur Sporangiophorenbildung ermittelt werden. Die Pearson-Korrelation für das Myzelwachstum beträgt für das resistente Allel -0,3 und für das anfällige Allel 0,39. Dabei ist ein Wert zwischen 0 und 1 als positiv korreliert und zwischen 0 und -1 als negativ korreliert zu beurteilen. Die Anwesenheit des resistenten Allels von SNP_988 ist dementsprechend mit einer niedrigeren Anfälligkeit assoziiert.

3.4 DNA-Sequenzierung eines *Rpv12*-tragenden Genotyps

Für eine exakte Analyse des *Rpv12*-Locus wurde der Genotyp 2014-099-0003 mittels SMRT-DNA-Sequenzierung in Zusammenarbeit mit Dr. Bruno Hüttel vom Max-Planck-Institut in Köln sequenziert. Zur Trennung der Haplotypen wurden die parentalen Genotypen mittels Illumina-Technologie von Dipl. Ing. Prisca Viehöfer vom CeBiTec der Universität Bielefeld sequenziert und durch M. Sc. Bianca Frommer im Rahmen ihrer Doktorarbeit in der AG Weisshaar assembliert.

Zur Absicherung der Verwandtschaft wurden SSR-Marker-Analysen entsprechend 2.2.2.4 durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Laut Literatur entstammen die Genotypen 28/19 und 4/15 einer Kreuzungslinie von *V. amurensis* und *V. vinifera*, die von der Arbeitsgruppe Koleda 1975 dokumentiert wurde. Diese Genotypen stehen jedoch für Analysen nicht mehr zur Verfügung. In Venuti *et al.* 2013 wurde ein Genotyp verwendet (*V. amurensis* NT10) welcher, ausgehend von den dort dokumentierten Genotypen, vermutliche Elterpflanze von `Kunbarat´ und `Kunleany´ ist und somit 28/19 entsprechen könnte.

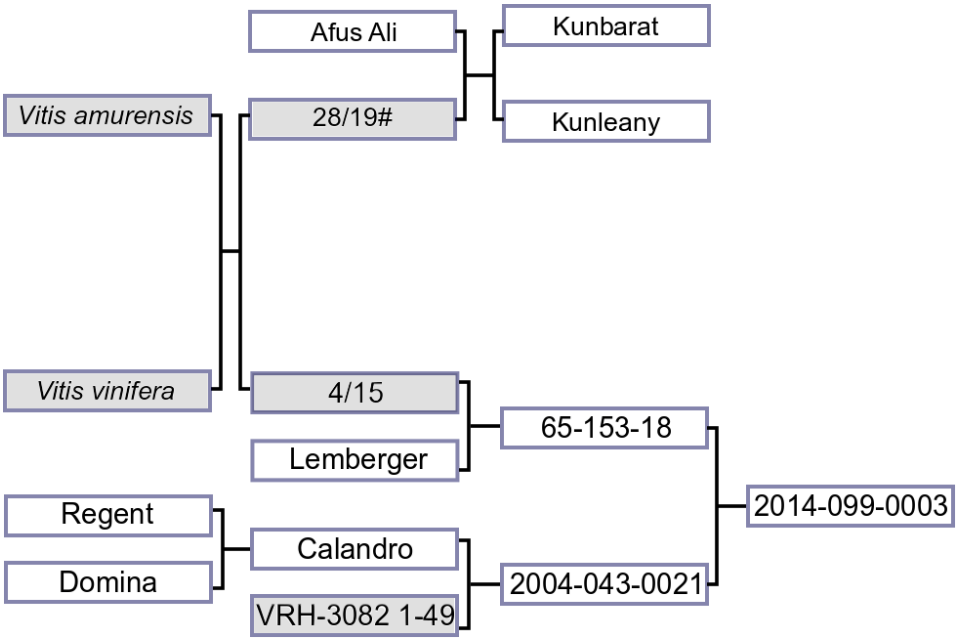


Abbildung 24: Stammbaum des Genotyps 2014-099-0003. Genotypen deren DNA nicht für Prüfungen zur Verfügung standen wurden grau unterlegt. Der paternale Genotyp 65-153-18 trägt die Resistenzloci *Rcg1* und *Rpv12*. Der maternale Genotyp 2004-043-0021 trägt die Resistenzloci *Rpv1*, *Rpv3.1*, *Run1*, *Ren3*, *Ren9*. Der sequenzierte Genotyp 2014-099-0003 trägt die Loci *Rcg1*, *Rpv12*, *Ren3* und *Ren9*.

Für das Kreuzungsprodukt 2014-099-0003 wurden mittels SMRT-Sequenzierung (ungetrimmt) 6.374.217 Fragmente mit insgesamt 70.961.317.394 bp sequenziert (Coverage 70,96x). Die durchschnittliche Sequenzlänge (bei Fragmenten über >500 bp) betrug 10.646 bp. Dabei waren die längsten Fragmente 175.687 bp und das kürzeste Fragment 500 bp groß. Die hiermit verbundenen Arbeiten wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Bruno Hüttel vom Max-Planck-Institut in Köln durchgeführt.

Für den maternalen Genotyp 2004-043-0021 wurden mittels Illumina (getrimmt) 809.660.042 Fragmente mit insgesamt 116.416.564.019 bp sequenziert (Coverage von 116,42x), während für den paternalen Genotyp 65-153-18 mittels Illumina (getrimmt) 973.991.963 Fragmente mit insgesamt 144.027.061.702 bp sequenziert wurden (Coverage 144,03x). Die Sequenzen der unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden wurden miteinander verrechnet, sodass die genomische Sequenz des Genotyps 2014-099-0003 in die beiden Haplotypen Gf9921 und Gf9918 differenziert werden konnte. Die hiermit verbundenen Arbeiten wurden von M. Sc. Bianca Frommer am CeBiTec der Universität Bielefeld durchgeführt.

Der N50-Wert betrug für den Haplotypen Gf9921 3,3 Mb und für den Haplotypen Gf9918 3,92 Mb. Dieser Wert gibt an, wie groß die Contigs sind, auf welcher über 50 % der gesamten Genomsequenz liegen. Weitere Daten zu den Haplotypen sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24: Datenübersicht zur Sequenzierung der Haplotypen Gf9921 und Gf9918. Aufgeführt sind hier die Anzahl an Sequenzen, die Größe der Haplotypen [Mb], die durchschnittliche Sequenz-Länge [kb], die längste Sequenz [Mb] sowie der N50-Wert der Haplotypen Gf9921 und Gf9918 [Kooperation mit Frommer, unveröffentlicht].

	Gf9921	Gf9918	Total
Sequenzen	1.245	1.253	2.498
Größe [Mb]	511	544	1.055
Durchschnittliche Sequenz-Länge [kb]	411	434	422
Längste Sequenzen [Mb]	14,81	18,07	18,07
N50 [Mb]	3,30	3,92	

Nach diversen bioinformatischen Schritten zur Assemblierung und ersten Zuordnungen der Contigs zu Pseudochromosomen, erfolgte eine Analyse der Pseudochromosomen mittels Dotplots.

Hierfür wurden die Pseudochromosomen gegeneinander und gegen das Referenzgenom PN40024 12X.v2 (Abbildung 25) gerechnet (Jaillon *et al.*, 2007; Canaguier *et al.*, 2017). Anschließend wurden potenzielle Fehl-Assemblierung (engl. *Mis-Assemblies*) unter Nutzung genetischer SSR-Marker rearrangiert. Beipielhaft ist dies an Pseudochromosom 8 gezeigt (vgl. Abbildung 25 und Abbildung 26).

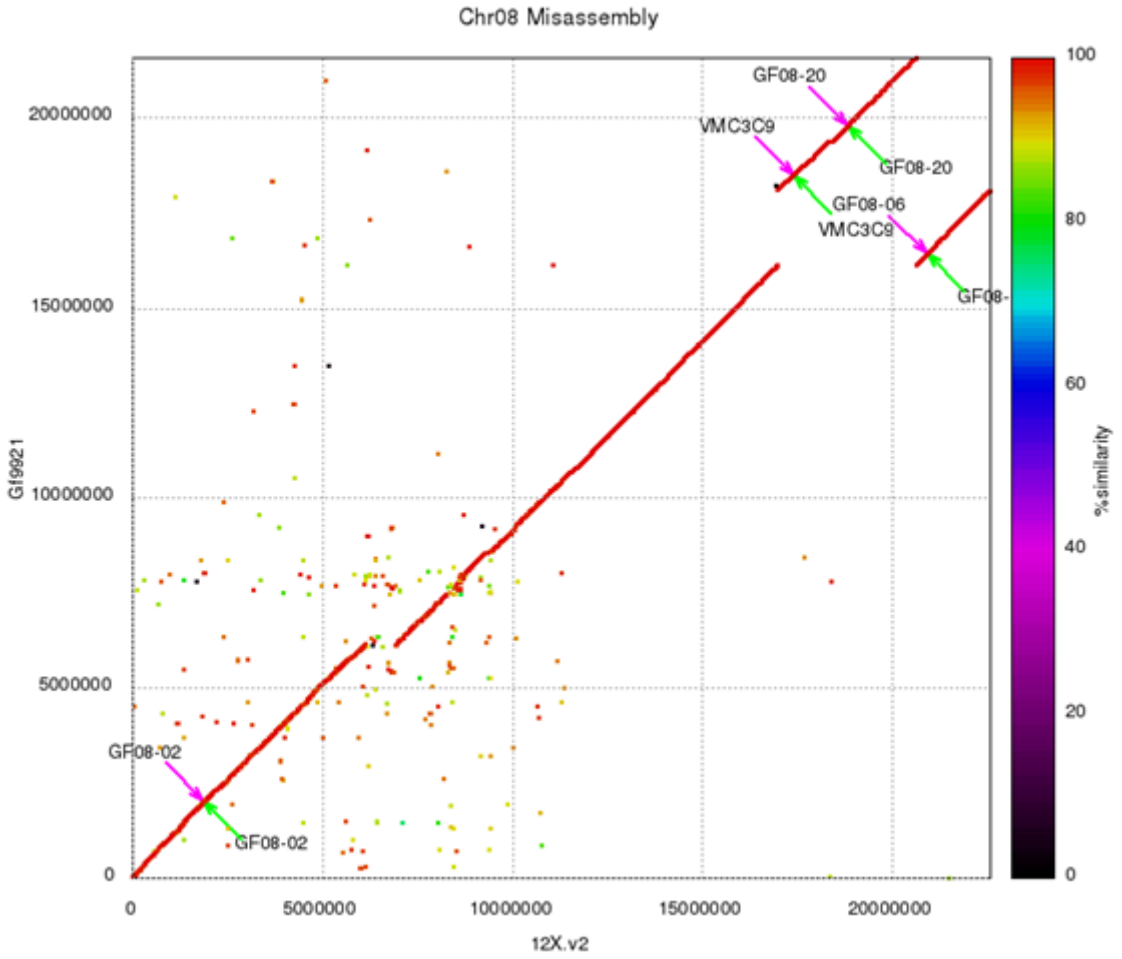


Abbildung 25: Dotplot des maternalen (chr08_p21) Pseudochromosoms 8 des Genotyps 2014-099-0003 gegen Chr08 des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 vor Korrektur. Gezeigt ist hier ein Dotplot des maternalen Pseudochromosoms 8 (Gf9921) des Genotyps 2014-099-0003 mit Bruchpunkten. Auf der y-Achse ist das Pseudochromosom 8 des Haplotyps Gf9921 gezeigt, während auf der x-Achse Chr08 des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 aufgeführt sind. Mittels Pfeilen (pink für den maternalen Haplotypen, grün für das Referenzgenom), sind die potenziellen Positionen der Region-assoziierten SSR-Marker eingezeichnet. Die Farbskala rechts zeigt die Ähnlichkeiten der Sequenzen an. Rot steht dabei für 100 %ige Übereinstimmung (Kooperation mit Frommer, unveröffentlicht).

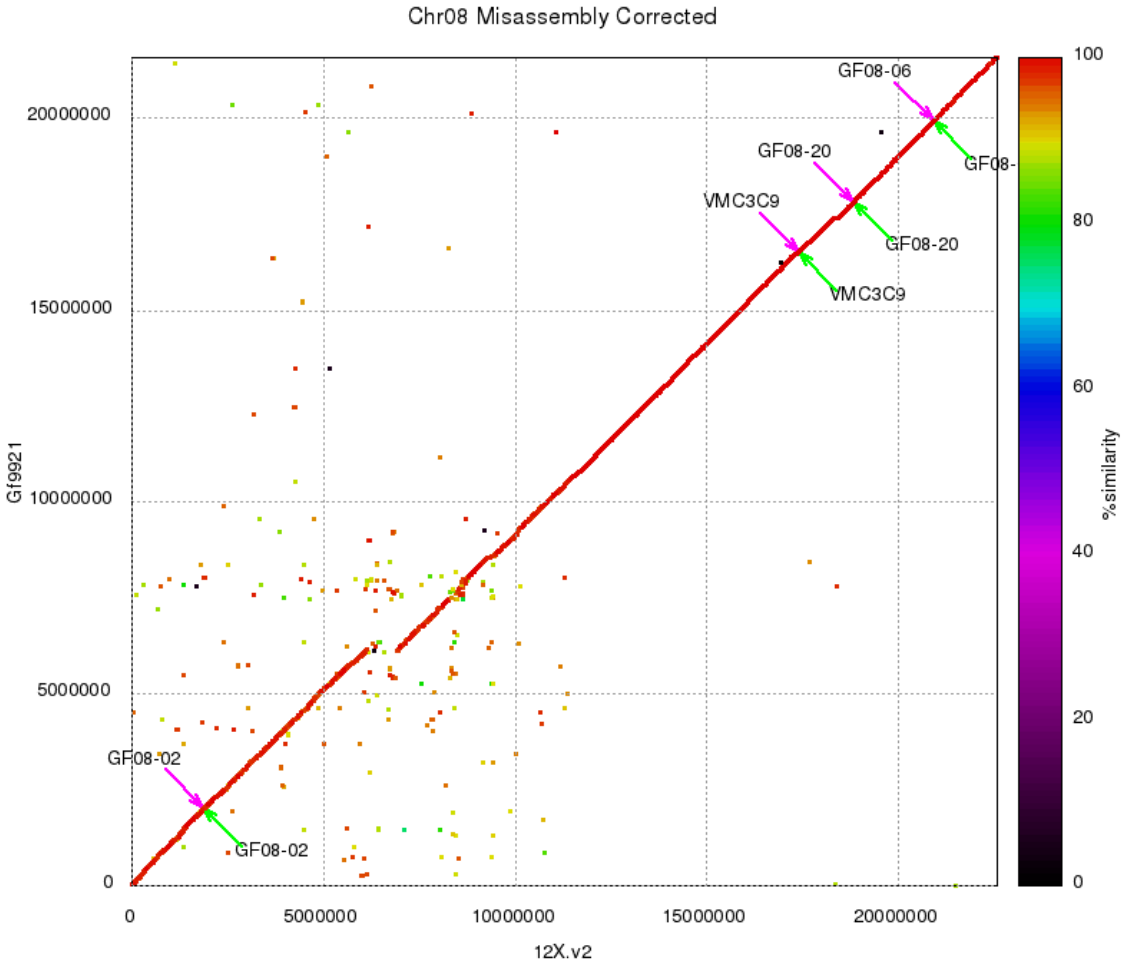


Abbildung 26: Dotplot des maternalen Pseudochromosoms 8 des Genotyps 2014-099-0003 gegen das Referenzgenom PN40024 12X.v2 nach Korrektur. Gezeigt ist hier ein Dotplot des maternalen Pseudochromosoms 8 (Haplotyp Gf9921) des Genotyps 2014-099-0003 nach einer Bearbeitung der Bruchpunkte (vgl. Abbildung 25). Auf der y-Achse ist das Pseudochromosom 8 des maternalen Haplotyps Gf9921 gezeigt, während auf der x-Achse das Referenzgenom PN40024 12X.v2 aufgeführt ist. Mittels Pfeilen (pink für den maternalen Genotyp, grün für das Referenzgenom), sind die potenziellen Positionen der Region-assoziierten SSR-Marker eingezeichnet. Die Farbskala rechts zeigt die Ähnlichkeiten der Sequenzen an. Rot steht dabei für 100 %ige Übereinstimmung (Kooperation mit Frommer unveröffentlicht).

Zur Analyse und Korrektur der Pseudochromosomen wurden insgesamt 203 SSR-Marker auf gDNA der verwendeten Genotypen 2014-099-0003, 2004-043-0021 und 65-153-18 angewendet. Davon zeigten 184 gut auszuwertende Peaks, wovon wiederum nur 155 segregierend waren, 29 waren nicht-segregierend.

Nach möglichst akkurater Zuordnung der Contigs zu den entsprechenden 19 Pseudo-Chromosomen ergaben sich die Pseudo-Chromosomengrößen, die in Abbildung 27 aufgeführt sind. Die Zuordnung erfolgte großteils entsprechend dem Referenzgenom PN40024 12X.v2. Contigs, die dem Pseudochromosom Chr00 zugeordnet werden konnten, wurden ebenfalls zu einem Chr00 zugeordnet. Contigs, die keinem

Pseudochromosom zugeordnet werden konnten, wurden unter ChrNh (engl. *No hits*) zusammengefasst.

Insgesamt konnten dem maternalen Haplotyp (Gf9921) 511.100.376 bp und dem paternalen Haplotyp (Gf9918) 544.153.731 bp zugeordnet werden. Die Länge der Pseudochromosomen ist in Abbildung 27 dargestellt.

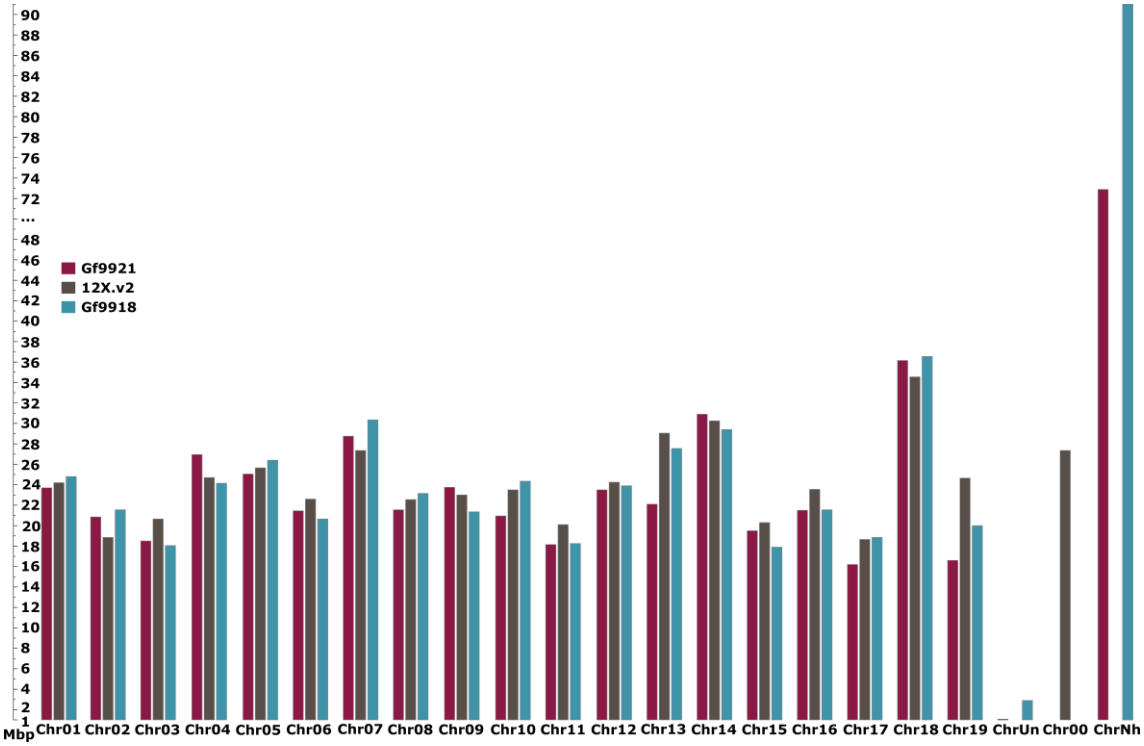


Abbildung 27: Grafische Übersicht der Pseudochromosomengrößen des Genotyps 2014-099-0003 aufgetrennt in seine Haplotypen Gf9921 und Gf9918. Dargestellt sind hier die Größen der unterschiedlichen Pseudochromosomen in Megabasen (Mb) der Haplotypen des Genotyps 2014-099-0003. Der maternale Haplotyp Gf9921 ist in pink, der paternale Haplotyp Gf9918 ist in blau dargestellt. Als Referenz dienen die Pseudochromosomen von PN40024 12X.v2 (Kooperation mit Frommer, unveröffentlicht).

Zur Überprüfung der Vollständigkeit des Genomassemblies wurde eine BUSCO-Analyse durchgeführt (engl. *Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs,* BUSCO v5 database eudicots_odb10, Simão *et al.*, 2015; Waterhouse *et al*., 2018).

Dabei wird anhand einer Datenbank nach Haushaltsgenen (engl. *plant core genes*) gesucht und basierend auf der Anzahl an Übereinstimmungen kann beurteilt werden, wie vollständig das Genom ist. Bei der Sequenzierung der Haplotypen Gf9921 und Gf9918 wurden 2160 bzw. 2130 einzeln vorliegende Gene identifiziert, die 2222 Genen im Referenzgenom PN40024 gegenüberstehen. Während PN40024 12X.v2 eine Abdeckung von 95,5 % aufweist, entsprechen die Sequenzen der Haplotypen Gf9918 und Gf9921 zu etwa 92,8 % bzw. 91,5 % dem BUSCO-Datensatz. Nimmt man auch die

duplizierten Gene hinzu kommt man auf eine noch stärkere Annäherung der verschiedenen Haplotypen: Gf9921 weist 2270 Gene (97,6 %) auf, Gf9918 2274 Gene (97,8 %) und PN40024 12X.v2 2270 Gene (97,6 %, vgl. Abbildung 28).

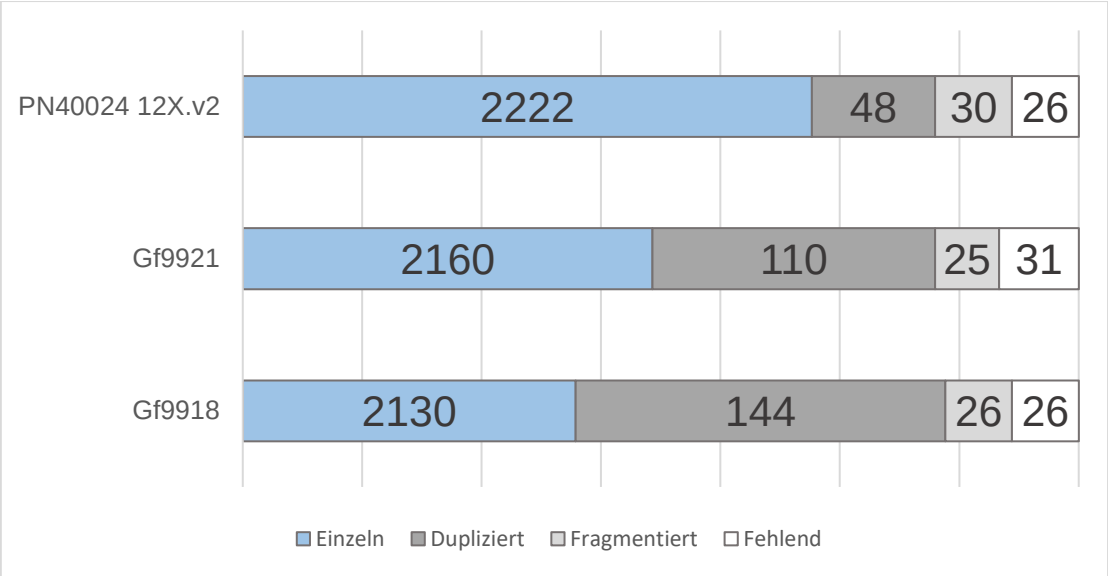


Abbildung 28: BUSCO-Analyse zur Bewertung der Qualität des Assemblies. Als Grundlage für die BUSCO-Analyse diente der Datensatz BUSCO v5 database eudicots_odb10. Hierbei zeigt sich eine starke Übereinstimmung der parentalen Haplotypen Gf9921 und Gf9918 mit dem Referenzgenom PN40024. Summiert man die einzelnen und duplizierten Gene miteinander, kommt man bei Gf9921 auf 2270 Gene (97,6 %), bei Gf9918 auf 2274 Gene (97,8 %) und bei PN40024 12X.v2 auf 2270 Gene (97,6%) (Kooperation mit Frommer, unveröffentlicht).

Nach Abschluss der Genomassemblierung wurde der Resistenz-assoziierte Sequenzabschnitt *Rpv12* des paternalen Haplotyps Gf9918 analysiert. Venuti *et al.*, die den *Rpv12*-Locus 2013 erstmalig beschrieben, führten ausgehend von den Markern UDV-014 (PN40024 12X.v2 Chr14:8034515..8034665) und UDV-370 (PN40024 12X.v2 Chr14:10109992..10110181) eine Feinkartierung durch.

Weitere Analysen erfolgten konzentriert auf den Sequenzabschnitt zwischen dem Marker UDV-350 (PN40024 12X.v2 Chr14:8963620..8963942) und dem Marker UDV-370, da diese von Venuti *et al.* (2013) als Locus-begrenzend beschrieben wurden und für Züchtungsarbeiten empfohlen werden. Bei dem maternalen Haplotyp Gf9921 liegt dieser Bereich zwischen Position 9.644.159 und 10.656.370 und bei dem paternalen Haplotyp Gf9918 zwischen Position 11.024.016 und 11.804.905.

Tabelle 25: Größenvergleich der *Rpv12*-Region zwischen PN40024 12X.v2, Gf9918 und Gf9921. Aufgeführt sind hier die Größen der durch Marker beschriebenen Sequenzen auf dem Referenzgenom PN40024 12X.v2 sowie den Haplotypen Gf9918 und Gf9921.

Locus-Größe	PN40024 12X.v2	Gf9918	Gf9921
UDV-014-UDV-370	2.075.666 bp	1.861.826 bp	1.829.750 bp
UDV-350-UDV-370	1.146.561 bp	780.888 bp	1.012.212 bp

Daraus ergeben sich Locus-Größen von 1.146.562 bp (PN40024 12X.v2), 1.012.211 bp (Gf9921) und 780.889 bp (Gf9918, Tabelle 25). Diese Differenz zeigt sich auch bei der näheren Analyse des Locus, welche mittels FGeneSH, NCBI-Blastx und HMMER erfolgte (Solovyev *et al.*, 2006; Altschul *et al*., 1990; Altschul *et al*., 1997; Eddy, 2011).

Während im Referenzgenom im Bereich des *Rpv12*-Locus 12 Sequenzen mit NLR-Motiven zu finden sind, wurden auf dem paternalen Haplotyp Gf9918 nur vier NLR-Motive identifiziert. Nach Auswertung von RNA-Seq-Daten eines nicht infizierten Blattes, welches im Serviceauftrag sequenziert und in Kooperation durch Bianca Frommer vom CeBiTec der Universität Bielefeld zur Genannotation des Gf.99-03 Genomassemblies (Genotyp 2014-099-0003) verwendet wurde, konnten im Bereich der mittels FGeneSH vorhergesagten Gene codierende Sequenzen (CDS) zugeordnet werden. Dabei zeigte sich, dass auf Gen 1 (# 1) zwei CDS-codierende mRNAs kartieren, *Gf9918_14g22616* und *Gf9918_14g22614*. Dabei codiert Gf9918_14g22616 für eine CC-NB-ARC-Domäne, während Gf9918_14g22614 für eine LRR-Domäne sowie eine Transmembran-Domäne codiert. Auch auf Gen 2 (# 2) liegen zwei Transkripte mit CDS. Hier codiert *Gf9918_14g22618* für eine CC-Domäne, während *Gf9918_14g22619* für eine NLR-Domäne codiert. Auf Gen 3 (# 3) und Gen 4 (# 4) codiert jeweils eine mRNA ein CDS für CC-NLR-Domänen: *Gf9918_14g22624* und *Gf9918_14g22626*. Das Splicing-Muster auf Nukleotid-Ebene aus der RNA-Seq Studie (nicht inokulierter Zustand) ist in Abbildung 29 dargestellt.

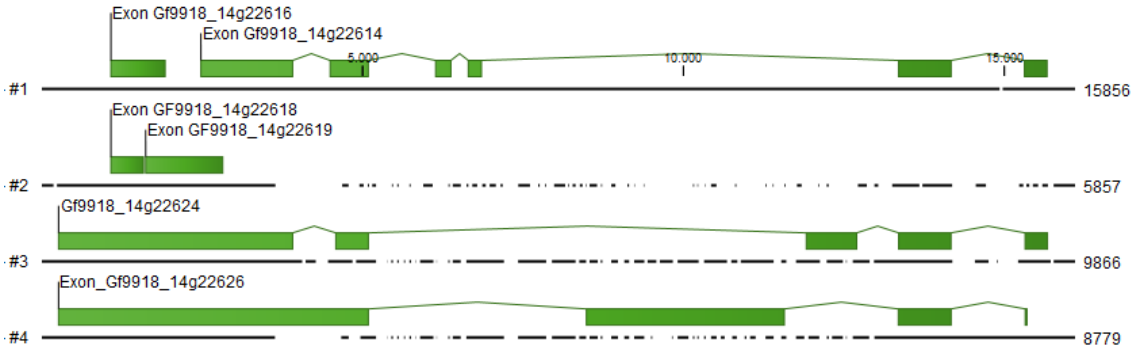


Abbildung 29: Splicing-Vorhersage von Kandidatengenen auf Nukleotid-Ebene des *Rpv12*-Locus. Dargestellt sind hier die vier Sequenzen der *NLR*-Gene im *Rpv12*-Locus #1-4, auf welchen verschiedene CDS auf Basis einer umfangreichen RNA-Sequenzierung kartiert werden konnten. Die Zahlenwerte entsprechen den Basenpaaren [bp] auf gDNA Ebene.

Eine Darstellung eines Alignments auf Proteinebene und der zu erwartenden Protein-Motive ist in Abbildung 30 gezeigt.

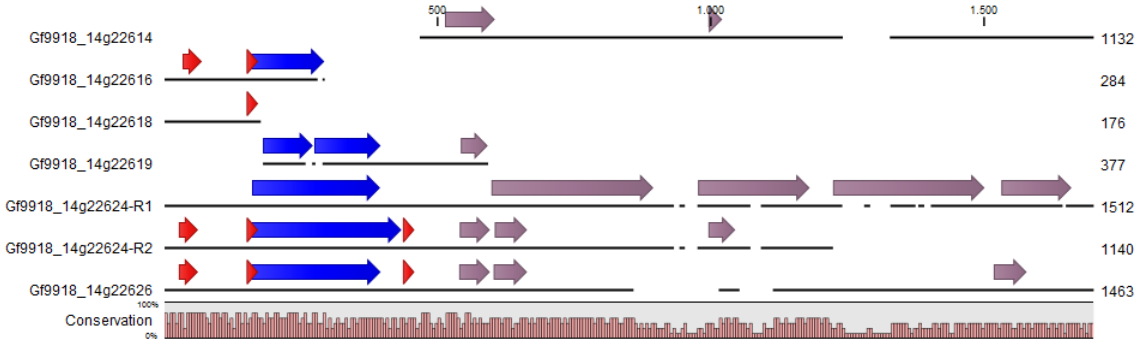


Abbildung 30: Alignment der zu erwartenden Protein-Motive der Kandidatengene im *Rpv12*-Locus. CC-Motive sind in rot, NB-ARC-Motive in blau und LRR-Motive in violett dargestellt. Es wurden unterschiedliche Isoformen (R1 und R2) des Gens Gf9918_14g22624 analysiert. Die Zahlenwerte entsprechen der Anzahl der Aminosäuren.

Durch BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) der Kandidatengene des *Rpv12*-Locus auf Nukleotid-Ebene mittels der Datenbank http://www.grapegenomics.com/ (Cantu Lab, 2021) konnten im Referenzgenom (PN40024 12X.v2) Gensequenzen identifiziert werden, welche den *NLR*-Genen des Haplotyps Gf9918 im *Rpv12*-Locus ähneln. Dabei ist die genomische Sequenz von *# 1* dem Gen *Vitvi14g02706* am ähnlichsten. Das Gen *# 2* entspricht am ehesten dem Gen *Vitvi14g00591*, während *# 3* und *# 4* am ehesten *Vitvi14g02729* entsprechen (vgl. Tabelle 26). Auch für die Proteinvorhersage (VCost.v3) der Referenzgene wurde die Datenbank http://www.grapegenomics.com/ verwendet.

Tabelle 26: Äquivalente aus dem Referenzgenom zu NLR-CDS im Haplotyp Gf9918. Aufgelistet sind hier *NLR*-tragende CDS, die mittels FGeneSH im *Rpv12*-Locus des Haplotyps Gf9918 (CDS auf Gf9918) identifiziert wurden, sowie ihre Länge in [bp], die Anzahl der Exons und die Länge der transkribierten Sequenz in Aminosäuren [AS]. Diese stehen im Vergleich zu ihren Protein-Äquivalenten nach VCost.v3. Die Protein-codierenden Sequenzen des Referenzgenoms sind in [AS] angegeben.

	Gf9918				VCost.v3	
Gen	CDS	Länge [bp]	Anzahl Exons	Länge [AS]	Protein-Äquivalente	Länge [AS]
# 1	Gf9918_1422614	3644	6	1132	Vitvi14g02706	1152
					Vitvi14g02711	313
# 1	Gf9918_1422616	852	1	283	Vitvi14g02706	1152
					Vitvi14g02712	440
					Vitvi14g00589	375
# 2	Gf9918_1422618	528	1	175	Vitvi14g00591	1080
					Vitvi14g00589	375
					Vitvi14g02712	440
# 2	Gf9918_1422619	1131	1	376	Vitvi14g00591	1080
					Vitvi14g00589	375
					Vitvi14g02712	440
# 3	Gf9918_1422624	4536	5	1511	Vitvi14g00691	1014
					Vitvi14g00574	553
					Vitvi14g02707	1781
					Vitvi14g00593	1501
					Vitvi14g02720	1375
					Vitvi14g02729	1618
					Vitvi14g00581	1363
# 4	Gf9918_1422626	4389	4	1462	Vitvi14g00691	1014
					Vitvi14g00574	553
					Vitvi14g02726	496

Auf Ebene von Aminosäuresequenzen aus der Annotation von VCost.v3 zeichnet sich ein abweichendes Bild: hier entsprechen dem Gen *Gf9918_1422614* die Analoga *Vitvi14g02706*, und *Vitvi14g02711*, während mit dem Gen *Gf9918_1422616* die Analoga *Vitvi14g02706*, *Vitvi14g02712* und *Vitvi14g00589* am meisten übereinstimmen.
Gf9918_1422618 und *Gf9918_1422619* weisen jeweils Übereinstimmungen mit den Genen *Vitvi14g00591*, *Vitvi14g00589* und *Vitvi14g02712* auf.

Gf9918_1422624 hat am meisten Übereinstimmungen mit den Analoga *Vitvi14g00691*, *Vitvi14g00574*, *Vitvi14g02707*, *Vitvi14g00593*, *Vitvi14g02720*, *Vitvi14g02729*, und *Vitvi14g00581*. Weiterhin ähnelt *Gf9918_1422624* sehr stark *Gf9918_1422626*. Dies schlägt sich auch in den Genanaloga des Referenzgenoms nieder: *Vitvi14g00691*, *Vitvi14g00574* und *Vitvi14g02726*.

Die Aminosäuresequenzen der identifizierten Gene, sowie der Gene aus dem Referenzgenom, wurden mittels HMMER (engl. *Hidden Markov Models*) auf Protein-Motive untersucht. Die Ergebnisse der Pfam- (engl. *Protein families*) und *coiled coil*-Analyse wurden in die Sequenzen übertragen (vgl. Abbildung 31 - Abbildung 34, https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/phmmer, Stand: 04.2021).

Bereits auf Nukleotidebene zeigen sich gravierende Unterschiede zwischen den *NLR*-Genen des Haplotyps Gf9918 und den Genen der Referenzsequenz PN40024 12X.v2 VCost.v3. Die Isoform R1 der CDS des Gens *Gf9918_14g22624* umfasst 5.287 bp, während die CDS des Gens *Vitvi14g02729* eine Länge von 13.068 bp aufweist. Die CDS von *Gf9918_14g22626* ist hingegen 4.389 bp lang. Auf Aminosäureebene zeigen sich ebenfalls deutliche Größenunterschiede. Hier zeigt sich, dass die Proteinsequenz von Gf9918_14g22624-R1 mit 1.512 Aminosäuren [AS] kleiner als Vitvi14g02729 (1.618 AS) ist.

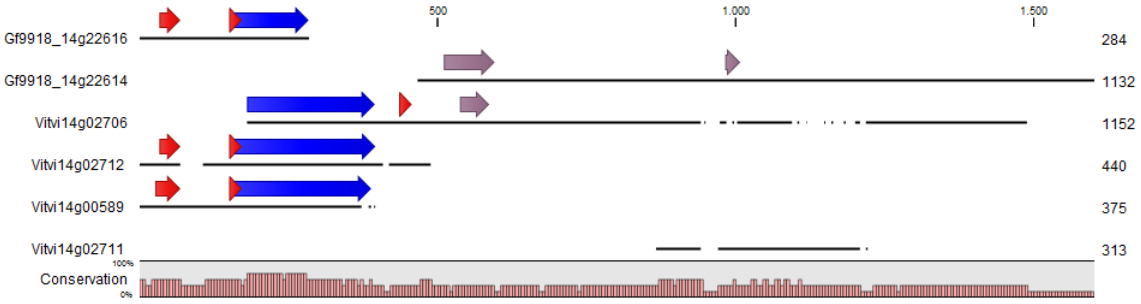


Abbildung 31: Vergleich der codierten Aminosäuresequenzen der Gene *Gf9918_1422614* und *Gf9918_1422616* mit den Genanaloga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 VCost.v3. Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen der Gene *Gf9918_1422614* und *Gf9918_1422616* des Haplotyps Gf9918 und der Analoga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 *Vitvi14g02706*, *Vitvi14g02712* und *Vitvi14g00589* mit den Motivannotationen NB-ARC (blau), CC (rot) und LRR (violett) sowie die Größen der Sequenzen und die Übereinstimmung untereinander (Conservation).

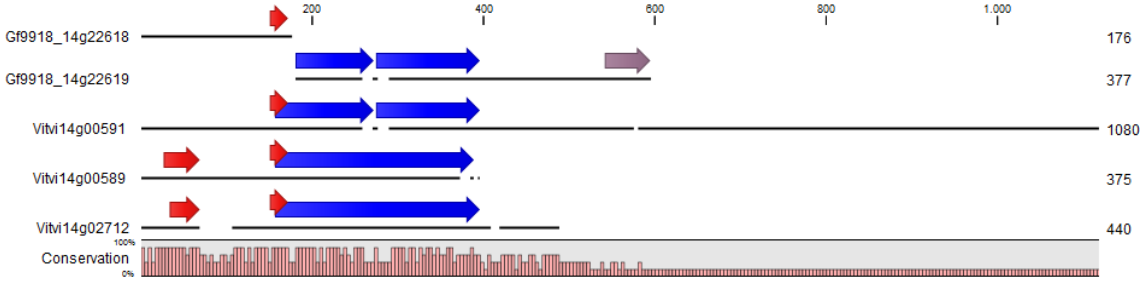


Abbildung 32: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Gene *Gf9918_1422618* und *Gf9918_1422619* mit den Genanaloga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 VCost.v3. Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen der Gene *Gf9918_1422618* und *Gf9918_1422619* des Haplotyps Gf9918 und der Analoga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 *Vitvi14g00591*, *Vitvi14g00589* und *Vitvi14g02712* mit den Motivannotationen NB-ARC (blau), CC (rot) und LRR (violett) sowie die Größen der Sequenzen und die Übereinstimmung untereinander (Conservation).

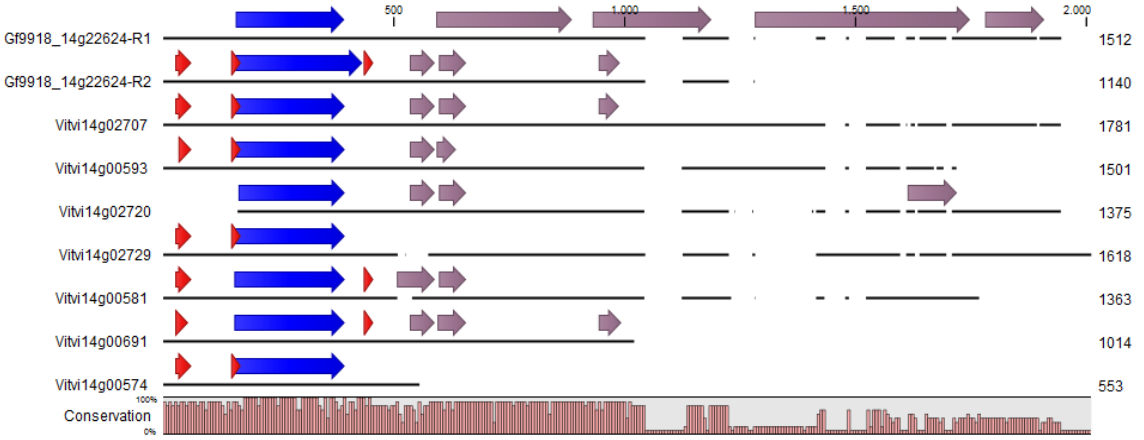


Abbildung 33: Vergleich der Aminosäuresequenz des Gens *Gf9918_1422624* mit den Genanaloga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 VCost.v3. Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen des Gens *Gf9918_1422624* des Haplotyps Gf9918 in unterschiedlicher Isoform (R1 & R2) und der Analoga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 *Vitvi14g02707*, *Vitvi14g00593*, *Vitvi14g02720*, *Vitvi14g02729*, *Vitvi14g00581*, *Vitvi14g00691* und *Vitvi14g00574* mit den Motivannotationen NB-ARC (blau), CC (rot) und LRR (violett) sowie die Größen der Sequenzen und die Übereinstimmung untereinander (Conservation).

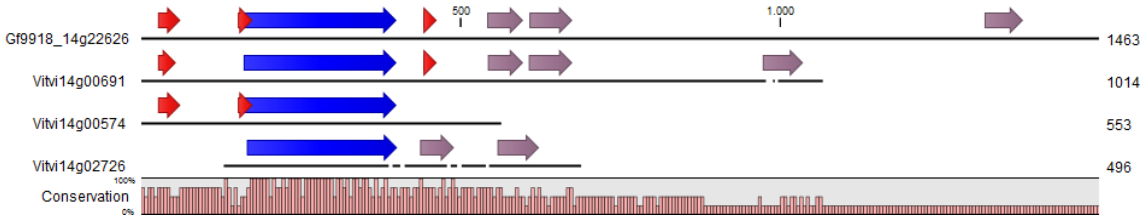


Abbildung 34: Vergleich der Aminosäuresequenz des Gens *Gf9918_1422626* mit den Genanaloga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 VCost.v3. Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen des Gens *Gf9918_1422626* des Haplotyps Gf9918 und der Genanaloga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 *Vitvi14g00691*, *Vitvi14g00574* und *Vitvi14g02726* mit den Motivannotationen NB-ARC (blau), CC (rot) und LRR (violett) sowie die Größen der Sequenzen und die Übereinstimmung untereinander (Conservation).

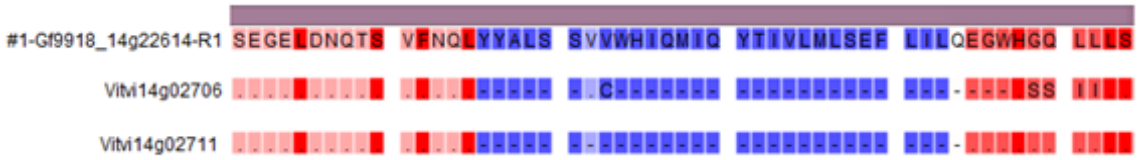


Abbildung 35: Vergleich der Aminosäuresequenz der LRR-Domäne des Gens *Gf9918_1422614* mit den Genanaloga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 VCost.v3. Rote Bereiche zeigen eine hohe Übereinstimmung an, blaue Bereiche eine geringe Übereinstimmung. Übereinstimmende Aminosäuren sind durch Punkte ersetzt.

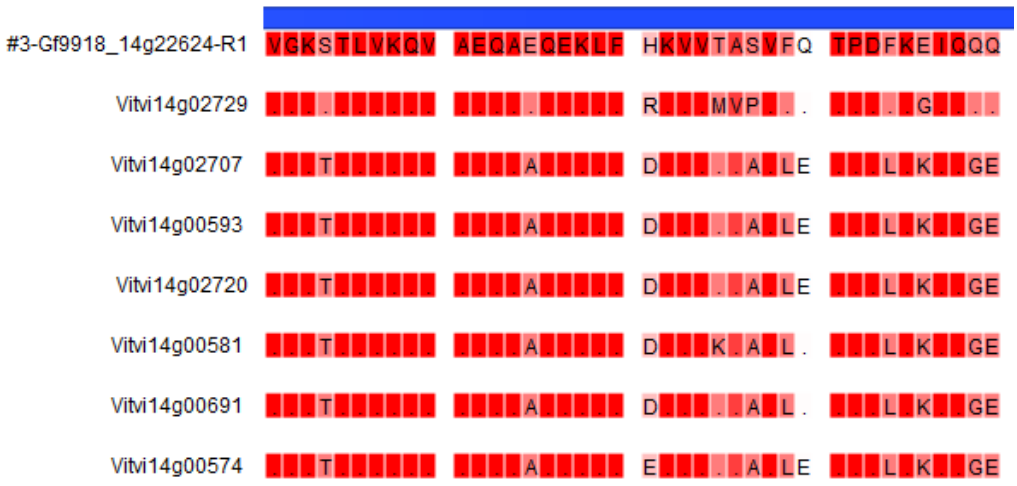


Abbildung 36: Vergleich der Aminosäuresequenz der NB-ARC-Domäne des Gens *Gf9918_1422624* mit den Genanaloga des Referenzgenoms PN40024 12X.v2 VCost.v3. Dunkelrote Bereiche zeigen eine hohe Übereinstimmung an, hellrote Bereiche eine geringere Übereinstimmung. Übereinstimmende Aminosäuren sind durch Punkte ersetzt.

Deutlich sieht man an der Conservation, dass es einige Abweichungen der Protein-Sequenzen voneinander gibt (Abbildung 31 bis Abbildung 34). Beispielhaft sind in Abbildung 35 und Abbildung 36 Detailansichten gezeigt. Es kommt bei den NLRs zu Insertionen, Deletionen und Aminosäure-Austauschen, wobei sich die veränderten Aminosäuren häufig in der Polarität unterscheiden. Die längste übereinstimmende Sequenz konnte mit 109 AS zwischen den Proteinen von Gf9918_14g22624 und Vitvi14g02729 identifiziert werden. Ein Alignment der genomischen Sequenz der maternalen Haplotypen Gf9921 war nicht möglich, da es zwar in der Sequenz zwischen den Marker UDV-350 und UDV-370 einige Fragmente gibt, die mittels BLAST als *NLR*-Gene identifiziert werden konnten, aber keine längeren Sequenzen die den Genen des Haplotyps Gf9918 entsprochen hätten. Auf Proteinebene konnten für das Gen *Gf9918_14g22624* vier Äquivalente auf dem maternalen Haplotyp identifiziert werden, für *Gf9918_14g22626* zwei Äquivalente und für *Gf9918_14g22614* ein Äquivalent.

3.4.1 Entwicklung neuer molekularer SSR-Marker und Vergleich des Locus *Rpv8* mit *Rpv12*

Basierend auf den Erkenntnissen der Sequenzanalyse konnten vier SSR-Marker im *Rpv12*-Locus entwickelt werden (vgl. Tabelle 27). Dafür wurden Repeats mit dem Programm WebSat (Martins *et al*., 2009; http://wsmartins.net/websat) ermittelt und flankierend Primer designed, die mit dem Programm Primer3Plus 2.4.0 (Untergasser *et al.*, 2012) auf eine T_m von 60 °C ausgerichtet wurden.

Tabelle 27: Neue Primerpaare zur Nutzung als SSR-Marker für den *Rpv12*-Locus. Aufgeführt sind hier Marker, die auf Basis des Haplotyps Gf9918 im *Rpv12*-Locus erstellt wurden, ihre Sequenz in 5‘-3‘-Orientierung sowie ihre Position im Verhältnis zu den *NLR*-Genen und die Schmelztemperatur (T_m) laut Herstellerangaben (Metabion, Planegg, Deutschland).

Marker	Sequenz (5‘-3‘)	Position	Tm [°C]
GF14-61-F	TAATAGGTTTTGTCGTCGTGGT	vor GF9918_1422614_16	58
GF14-61-R	TTACATTCACATGCACAAGGTC		58
GF14-62-F	ACCATTGTTCGGGATTTAGC	zwischen GF9918_1422614_16 und GF9918_1422618_19	56
GF14-62-R	TATAGAGGGCACCACCTTTCTC		62
GF14-63-F	TATCGTTCACCCACAAATGGTA	zwischen GF9918_1422614_16 und GF9918_1422618_19	58
GF14-63-R	TGGACTGACATACAACATGCAAG		61

Marker	Sequenz (5‘-3‘)	Position	Tm [°C]
GF14-64-F	CATAAAGGGCTGAGTGAGAGGT	zwischen GF9918_1422618_19 und GF9918_1422624	62
GF14-64-R	TTAAGGGGAAGTGTTGACAGGT		60

Die erwarteten Fragmentgrößen lagen für GF14-61 bei 298 bp, für GF14-62 bei 281 bp, für GF14-63 bei 395 bp und für GF14-64 bei 375 bp (vgl. Tabelle 28).

Mittels SSR-Marker-Analyse konnte für den Marker GF14-61 ein Fragment der Größe 299 bp dokumentiert werden, dieses war allerdings bei Testung auf den KbOPs (vgl. Tabelle 27) auch bei anfälligen Genotypen vertreten, nicht jedoch auf den für *Rpv12*-negativ getesteten und teilweise für *P. viticola* anfälligen Sorten `Afus Ali´, `Cabernet franc´, `Calandro´, `Domina´, `Irsai Oliver´, Kozma Csft 2423, `Muskat Ottonel´, 2004-043-0021, `Pinot Noir´, `Rani Rizling´ und `Traminer´. Eine abweichende Allelgröße von 277 bp zeigte der Genotyp *Vitis amurensis* Ruprecht (VAR-Colmar), bei welchem es sich um den Genotyp des Ursprungs des Locus *Rpv8* handelt. DNA von VAR-Colmar wurde freundlicherweise vom Institut für Rebenzüchtung der Hochschule Geisenheim zur Verfügung gestellt. Der SSR-Marker GF14-62 zeigte sich zwar mit einem Peak bei 283 bp spezifisch (Abweichung um 2 bp von Gf9918-Sequenz), allerdings ist das Peak-Muster des Markers schwierig auszuwerten. Hingegen konnte dem Marker Gf14-63 eine *Rpv12*-spezifische Allelgröße von 398 bp zugeschrieben werden. Bei anfälligen Genotypen fiel die Allelgröße mit bis zu 448 bp meist deutlich größer oder komplett aus. Der Marker GF14-64 zeigte sich unspezifisch für den *Rpv12*-Locus.

Tabelle 28: Auswahl einiger Marker im *Rpv12*-Locus und ihrer unterschiedlichen Fragmentgrößen bei *Rpv12* und *Rpv8*-Trägern. Dargestellt sind hier eine Auswahl von Markern im *Rpv12*-Locus, ihre Position auf dem Haplotyp Gf9918, die Sequenz laut bioinformatischer Vorhersage, sowie die Sequenzbereiche laut SSR-Marker-Analyse getrennt nach *Rpv12*-Trägern (Kunbarat) und *Rpv8* (*Vitis amurensis* Ruprecht, VAR-Colmar). Marker mit Unterschieden zwischen *Rpv8* und *Rpv12* sind in Fettschrift gehalten.

	Position	Größe laut Sequenz	SSR-Marker-Daten [bp]	SSR-Marker-Daten [bp]
	Gf9918	Gf9918	*Rpv12*	*Rpv8*
Chr14V015	Chr14:8.472.861	212 bp	212 bp	212 bp
GF14-31	Chr14:10.380.759	216 bp	215 bp	215 bp
sc81_7.4	Chr14:10.464.607	275 bp	275 bp	275 bp
sc81_8.2	**Chr14:10.819.650**	**263 bp**	**265 bp**	**-**
UDV-350	**Chr14:11.024.016**	**309 bp**	**310 bp**	**308 bp**
UDV-343	Chr14:11.111.362	161 bp	160 bp	160 bp
GF14-24	Chr14:11.125.705	262 bp	261 bp	261 bp
UDV-345	Chr14:11.158.394	218 bp	219 bp	219 bp
UDV-340	Chr14:11.236.312	179 bp	179 bp	179 bp
GF14-61	**Chr14:11.407.594**	**298 bp**	**300 bp**	**277 bp**
GF14-62	Chr14:11.432.947	281 bp	283 bp	283 bp
GF14-63	Chr14:11.434.303	395 bp	398 bp	398 bp
GF14-64	Chr14:11.447.555	375 bp	375 bp	375 bp
UDV-360	Chr14:11.644.506	208 bp	208 bp	208 bp
UDV-370	**Chr14:11.804.709**	**197 bp**	**198 bp**	**196 bp**
VMC2H12	**Chr14:11.954.402**	**102 bp**	**99 bp**	**113 bp**

Der Genotyp VAR-Colmar weicht neben GF14-61 auch in den Markern sc81_8.2, UDV-350, UDV-370 und VMC2H12 von den *Rpv12*-assoziierten Allelgrößen ab.

3.5 Der Genotyp DEU098-2006-017

Im Verlauf der Arbeiten wurden auf der Suche nach dem paternalen Genotyp von `Kunbarat´ und `Kunleany´ (Koleda 28/19) verschiedene Genotypen mit *V. amurensis*-Hintergrund hinsichtlich ihrer genetischen Konstitution und ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber *P. viticola* untersucht. Hierfür wurde von allen Reben, die in der Genbank des Geilweilerhofs unter *V. amurensis* gelistet sind, Winterholz genommen und dieses zu Gewächshausreben angezogen. Die Pflanzen wurden im Rahmen von Blattscheibentests und SSR-Markeranalysen hinsichtlich ihrer Resistenz untersucht. Dabei konnte ein Genotyp (DEU098-2006-017), der fälschlicherweise in der Datenbank GBVitis mit der Bezeichnung *V. amurensis* geführt wurde, ampelographisch nicht zu *V. amurensis* zu zählen ist und zu dem bis dato keine *Plasmopara*-Resistenz-Informationen vorlagen, als stark widerstandsfähig identifiziert werden. Der Genotyp DEU098-2006-017 ist mit dem Genotyp DEU098-2006-018 genetisch identisch. Allerdings ist die Herkunft dieser beiden Genotypen laut Dokumentation der Genbank unterschiedlich und möglicherweise nicht zutreffend. Der Genotyp DEU098-2006-017 wurde 2006 am Geilweilerhof gepflanzt und stammt aus dem botanischen Garten in Freiburg. Der Genotyp DEU098-2006-018 stammt hingegen aus dem botanischen Garten in Bochum. Für weitere Versuche wurde der Genotyp DEU098-2006-017 verwendet. Dr. Erika Maul konnte DEU098-2006-017 anhand ampelographischer Merkmale als eine Kreuzung aus *V. riparia* und *V. rupestris* benennen (vgl. Abbildung 37, Abbildung 38, Abbildung 39). Charakteristische Merkmale der Art *V. riparia* sind weiche Blätter mit einem langen Endzahn. Eingehüllte Triebspitzen hingegen sprechen für *V. rupestris*. Auch Befall durch *Daktulosphaïra vitifoliae* spricht für *V. rupestris* (vgl. Abbildung 40). Allerdings sind die Blätter von *V. rupestris* deutlich härter als jene des Genotyps DEU098-2006-017, was wiederum die Annahme einer Kreuzung mit *V. riparia* stützt. Die Triebspitze bei *V. rupestris* ist nur halb umhüllt (Galet, 1999).

Der Genotyp DEU098-2006-017 ist vermutlich weiblich oder hermaphroditisch, da er im Sommer 2020 Beeren trug. Eine nähere Abklärung des Geschlechts ist im Frühjahr 2021 durchzuführen.

Abbildung 37: Der Genotyp DEU098-2006-017 in Parzelle 3 der Liegenschaften des Geilweilerhofs, Siebeldingen. Gut zu sehen ist der lange Endzahn, welcher für die Art *V. riparia* charakteristisch ist. Der Befall durch *Daktulosphaïra vitifoliae* spricht hingegen für *V. rupestris*. Gallen, die den Befall durch *Daktulosphaïra vitifoliae* anzeigen, sind mittels weißer Pfeilspitzen markiert

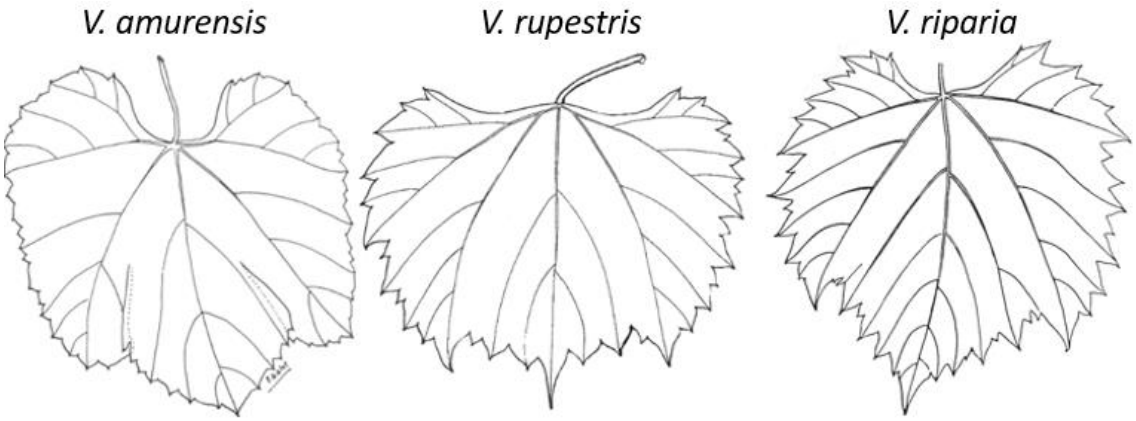


Abbildung 38: *V. amurensis* im Vergleich zu *V. rupestris* und *V. riparia.* Abgebildet sind hier schematische Zeichnungen von Blättern der Rebarten *V. amurensis* (links, Galet, 1999), *V. rupestris* (mittig, Galet, 1999) und *V. riparia* (rechts, Bailey, 1934). Deutlich zu sehen ist der Unterschied der Bezahnung. Während die Zähne der Blätter von *V. amurensis* ogival (spitzbogig) sind, zeigen sich die Zähne von *V. rupestris* und *V. riparia* spitz zulaufend.

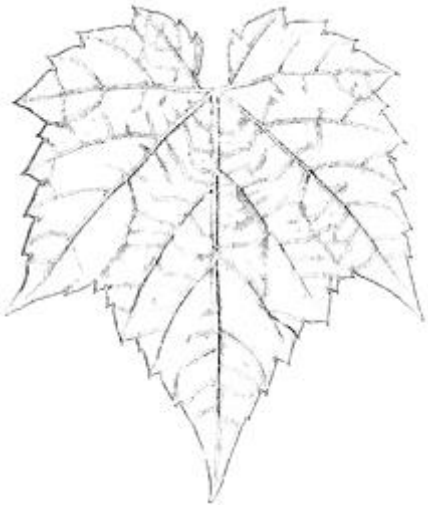


Abbildung 39: Schematische Darstellung eines Blattes des Genotyps DEU098-2006-017. Abgebildet ist hier eine schematische Zeichnung eines Blattes des Genotyps DEU098-2006-017. Deutlich zu sehen sind die langen Endzähne.

Abbildung 40: Ein Vertreter der Art *Vitis rupestris* in Parzelle 3 der Liegenschaften des Geilweilerhofs, Siebeldingen. Deutlich zu erkennen ist der schwere Befall durch *Daktulosphaïra vitifoliae* durch die massive Ausbildung von Blattgallen (links) und die eingehüllte Triebspitze (rechts).

2009 beschrieben Marguerit *et al.*, dass die Resistenz der *V. riparia* `Gloire de Montpellier´ durch QTLs auf den Linkage Groups 9 (*Rpv5*) und 12 (*Rpv6*) zurückzuführen ist. Hierzu nutzten sie eine Population aus *V. vinifera* `Cabernet Sauvignon´ x *V. riparia* `Gloire de Montpellier´, welche 138 Individuen umfasste und verwendeten 212 Marker. Die Marker VVIO52 (*Rpv5*, Merdinoglu *et al.*, 2005) und VMC8G9 (*Rpv6*, Doligez *et al*., 2006) wurden als Resistenz-assoziiert beschrieben.
Basierend auf bekannten Resistenz-assoziierten Markerdaten (Maul *et al.*, 2021) wurde versucht die Resistenz zu ermitteln (vgl. Tabelle 29). Der Genotyp DEU098-2006-017 teilt sich bei Marker VVIO52 ein Allel mit *V. riparia* `Gloire de Montpellier´. Dieselbe Allelgröße von 384 bp konnte allerdings auch bei den Genotypen `Merzling´, `Regent´ und `Solaris´ dokumentiert werden (Tabelle 30). Weshalb dieses Allel als nicht Resistenz-assoziiert zu bewerten ist und der Locus *Rpv5* auszuschließen ist.

Tabelle 29: Übersicht der Genotypen und Marker die zur Überprüfung möglicher Resistenz-assoziierter Loci auf dem Genotypen DEU098-2006-017 genutzt wurden. Aufgeführt sind die Namen der Genotypen, die assoziierten Loci und die Resistenz-assoziierten Marker (Maul *et al*., 2021).

Genotypen	Locus	Resistenz-assoziierter Marker
`Bayard´	*Rpv3*$^{null-287}$	UDV-305 UDV-737
`Bianca´	*Rpv3*	UDV-305
`Boerner´	*Rpv14*	GF05-13
`Kunbarat´	*Rpv12*	UDV-014 UDV-304 UDV-370
`Kunleany´	*Rpv12*	UDV-014 UDV-304 UDV-370
`Merzling´	*Rpv3.3* (=*Rpv3*$^{null-271}$)	VVIN16 UDV-737
`Munson´	*Rpv3.2* (=*Rpv3*$^{null-297}$)	UDV-305 UDV-737
`Noah´	*Rpv3.3* (=*Rpv3*$^{null-271}$) *Rpv3*$^{321-312}$	UDV-305 UDV-737
`Regent´	*Rpv4*	VMC7h3
`Regent´	*Rpv3.1*	UDV-112 VMC7f2
Riparia Gloire de Montpellier	*Rpv5*	VVIO52
Riparia Gloire de Montpellier	*Rpv6*	VMC8g9
Seibel 4614	*Rpv3.1* (=Rpv3$^{299-279}$)	UDV-305 UDV-737
`Solaris´	*Rpv11*	VCHR05C
`Solaris´	*Rpv10*	GF09-46
Vitis amurensis Rpv8	*Rpv8*/*Rpv12*	UDV-014 UDV-304 UDV-370

Genotypen	Locus	Resistenz-assoziierter Marker
VRH3082 1-42	*Run1*/*Rpv1*	VMC4f3.1 VMC8g9
`Villard blanc´	*Rpv3.1* (=*Rpv3*$^{299-279}$)	GF18-06 GF18-08

Tabelle 30: Markeranalyse des Genotyps DEU098-2006-017. Gezeigt sind die Markerdaten der Genotypen `Riparia Gloire de Montpellier´(RipGdM) und DEU098-2006-017 (VAR-017) in Referenz zu verschiedenen *Rpv3*-tragenden Genotypen (`Merzling´, `Regent´, `Solaris´). Angegeben ist der *Rpv3* Locus mit seinen Varianten *Rpv3*.1, *Rpv3*.2 und *Rpv3*.3 und die mit der Resistenz assoziierte Allelgröße. Einige Marker sind doppelt aufgeführt, da sie je nach Allelgröße unterschiedliche Loci beschreiben. Weiterhin aufgeführt sind die Marker VVIU37 (*Rpv5*), VVIO52 (*Rpv5*) und VMC8G9 (*Rpv6*). Für diese Marker ist die Resistenz-assoziierte Fragmentgröße nicht bekannt.

Marker	RipGdM	VAR-017	`Merzling´	`Regent´	`Solaris´	Locus	Größe
GF18-06	382/386	382/398	374/374	382/**388**	374/**388**	*Rpv3.1*	388
UDV-737	**283**/309	307/327	275/289	**283**/299	275/309	*Rpv3.1*	283
GF18-06	382/386	382/398	374/374	382/388	374/388	*Rpv3.2*	406
UDV-737	283/309	307/327	274/288	282/298	274/308	*Rpv3.2*	302
GF18-01	272/282	272/284	274/278	276/280	268/**278**	*Rpv3.3*	278
GF18-04	218/218	214/218	**216**/228	224/230	**216**/222	*Rpv3.3*	216
UDV-737	283/309	307/327	**275**/289	283/299	**275**/309	*Rpv3.3*	275
VVIU37	**227**	**227**/231	000/000	**227**/231	**227**/231	*Rpv5*	unbekannt
VVIO52	384/386	384	384/388	374/384	384	*Rpv5*	unbekannt
VMC8G9	169	181/183	173/185	177/223	179/185	*Rpv6*	unbekannt

Die Resistenzloci *Rpv3.1, Rpv3.2, Rpv3.3, Rpv4, Rpv5*, *Rpv6*, *Rpv7*, *Rpv8*, *Rpv10*, *Rpv12*, *Rpv14* konnten bei DEU098-2006-017 auf Grundlage von Markeranalysen ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Dafür wurden die unter http://www.vivc.de/loci aufgelisteten Marker (Stand: 2020) verwendet, sofern diese dem Institut zur Verfügung standen.

Vergleicht man das Myzelwachstum nach Inokulation des Genotyps DEU098-2006-017 mit den Genotypen `Italia´, `Kunbarat´ und 2014-099-0003, kann festgestellt werden, dass die Resistenz von DEU098-2006-017 nahezu ebenso stark ist wie die des Genotyps 2014-099-0003 (vgl. Abbildung 41). Beide Genotypen sind deutlich resistenter als der Genotyp `Kunbarat´, welcher auf Grund des *Rpv12*-Locus wiederum ein deutlich verringertes Myzelwachstum im Vergleich zu `Italia´ hat. Mit dem Genotypen DEU098-

2006-017 konnte also ein Genotyp mit deutlicher Resistenz gegenüber *P. viticola* identifiziert werden, welcher keinen bekannten *Rpv*-assoziierten Locus trägt.

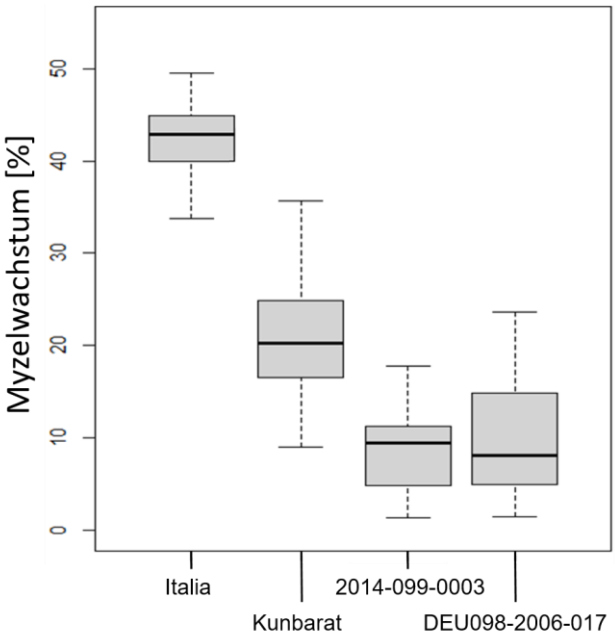


Abbildung 41: Vergleich des Myzelwachstums von DEU098-2006-017 mit *Rpv12*-tragenden und einem anfälligen Genotypen. Gezeigt ist das Myzelwachstum der Genotypen `Italia´, `Kunbarat´ und 2014-099-0003 im Vergleich zum Genotyp DEU098-2006-017, welches unter Nutzung von Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) auf Basis einer mikroskopischen Blattscheibenanalyse ermittelt wurde. Deutlich zu sehen ist, dass das Myzelwachstum des Genotypen DEU098-2006-017 im Vergleich zur anfälligen Rebsorte `Italia´ ähnlich stark inhibiert ist wie das des Genotyps 2014-099-0003.

4 Diskussion

Zur Analyse des Infektionsweges von *Plasmopara viticola* in resistenten Genotypen mit Kombinationen verschiedener Resistenzloci (Pyramidisierungen), sowie zur Eingrenzung und Untersuchung der Resistenzloci wurden mikroskopische und molekularbiologische Methoden angewandt. Im Rahmen der mikroskopischen Analyse wurden verschiedene Färbemethoden wie Anilinblau- (Kallose) und alkalische Anilinblau-Färbung (Myzel), Auramin O- (Lignin und Suberin), Acridinorange- (Nukleinsäuren) und Resorcin-Färbung (Kallose), Nitrotetrazoliumblau (NBT, $O_2^{\bullet -}$) und Diaminobenzidin (DAB; H_2O_2) eingesetzt. Zur genetischen Eingrenzung des *Rpv12*-Locus wurden zunächst Genotypisierungen mit SSR- und CAPS-Markern durchgeführt. Bioinformatische Analysen der Region des Resistenzlocus *Rpv12* erfolgten zunächst auf dem Referenzgenom PN40024. Später wurde in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Genomzentrum Köln der Max-Planck-Gesellschaft (Arbeitsgruppe Dr. Bruno Hüttel) und dem Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) der Universität Bielefeld (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bernd Weisshaar) ein *de novo*-Assembly des Genotypen 2014-099-0003 durchgeführt und der *Rpv12*-tragenden Haplotyp (Gf9918) näher betrachtet.

4.1 Mikroskopische Analysen des Infektionsprozesses durch *Plasmopara viticola*

4.1.1 Der *Rpv12*-Locus inhibiert früh das Myzelwachstums von *Plasmopara viticola*

Zur Ermittlung des Zeitpunkts, an welchem die Pathogenabwehr eintritt, wurden mikroskopische Analysen mit alkalischer Anilinblau-Färbung nach experimenteller Inokulation durchgeführt. Die Anilinblau-Färbung ist eine weit verbreitete Färbemethode, welche in der Mikroskopie und Histologie von Phytopathogenen breite Anwendung findet. In der Medizin dient der Farbstoff Anilinblau zur Anfärbung von Collagen, während es bei der Pflanzenanalyse vor allem in Verbindung mit Kallose erwähnt wird (Hood & Shew, 1996; Atiakshin *et al*., 2020). In Kombination mit KOH-Vorbehandlung wird es jedoch zu einem sinnvollen Werkzeug, um das Myzelwachstum von *P. viticola* und anderen Oomyzeten zu untersuchen. Dabei wird nicht erwähnt, woran genau es bindet. Zumeist ist von Polysacchariden und Glukanen die Rede. Zu den Polysacchariden zählen Cellulose und Chitin (Salmon & Hudson, 1997). Dem Reich der *Stramenophyla*, dem auch *P. viticola* zugeordnet wird, und welches sich aus heterokonten Algen

entwickelt hat, ordnet man vor allem Cellulose als Zellwandbestandteil zu (Alexopoulos *et al.*, 1996; Werner *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu enthält die Zellwand höherer Pilze vor allem Chitin und β-Glukan-Polymere. Doch auf Grund des Nachweises von Chitinasen im Rahmen der Pflanzenabwehr von Oomyzeten bei Kartoffeln, Pfeffer und Reben, sowie der Amplifikation von zwei *CHS*- (Chitin Synthase) Genen aus *P. viticola*, steht es mittlerweile außer Frage, dass auch Chitin in der Zellwand von *P. viticola* vertreten ist (Busam *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2002).

Zur Untersuchung des Myzelwachstums wurden die Zeitpunkte 6, 24, 48 und 72 hpi gewählt. Bereits nach 6 hpi konnte die Ausprägung von Primärhyphen in allen beobachteten Genotypen dokumentiert werden. Nach 24 hpi kommt es allerdings in den Genotypen, die im *Rpv12*-Locus homozygot sind, zu einem verminderten Hyphenwachstum. Bei allen Genotypen, mit Ausnahme der im Locus *Rpv12* homozygoten Genotypen Hozy01 und Hozy10, kann die Ausbildung von Haustorien beobachtet werden. Besonders auffällige Haustorien sind bei dem Genotypen 2014-099-0003 zu beobachten. Auch bei den *Rpv12* Trägern `Kunbarat´, `Kunleany´ konnten deutliche Haustorien dokumentiert werden. Die Bildung von Haustorien stellt eine Schlüsselfunktion für *P. viticola* dar. In Untersuchungen von Díez-Navajas *et al*. (2008) konnte gezeigt werden, dass in nicht-Wirtspflanzen die Ausprägung von Haustorien gestoppt wurde. In resistenten Rebsorten wurden Abwehrreaktionen ausgelöst, sobald die Haustorien sichtbar ausgebildet waren (Díez-Navajas *et al*., 2008).

In Wang *et al*., 2009, konnte zudem gezeigt werden, dass Rpw8.1, ein Protein, das bei *Arabidopsis thaliana* eine Resistenz gegen den Erreger des Mehltaus *Golovinomyces spp.* vermittelt, in die extrahaustoriale Membran induziert wird und dort eine Salicylsäure-abhängige Abwehrstrategie aktiviert. Dies führt zu einer Umhüllung des Haustorienkomplexes und der Akkumulation von H_2O_2. Rpw8.1 und Rpw8.2 wurden zuvor als Proteine beschrieben, die Transmembran- sowie CC-Domänen beinhalten (Xiao *et al*., 2001). Eine erhöhte Expression von Genen, die bei *Rpv12*-Trägern an der Salicylsäure-Synthese beteiligt sind, beschrieben Chitarrini *et al.*, 2020, bei einer umfassenden Transkriptom und Metabolom-Analyse. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass Proteine die in ihren Domänen dem Rpw8.1-Protein ähnlich sind, in einen Abwehrprozess gegen *P. viticola* involviert sind.

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass hier bereits durch *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) das Pathogen von der Pflanze identifiziert wird und die PTI (engl. *PAMP triggered immunity*) eintritt. Bei den homozygoten Genotypen Hozy01 und Hozy10 wird das Myzelwachstum zwischen 6 und 24 hpi stark inhibiert und

es finden sich immer weniger Zoosporen. Dies könnte für eine starke und frühe Synthese und Sekretion von ROS sprechen. Selbst nach 11 Tagen konnten bei den Genotypen Hozy01 und Hozy10 keine Sporangiophoren detektiert werden. Die Analysen zeigen, dass es sich um eine post-Penetrationsresistenz handelt.

4.1.2 Die Zoosporen erreichen Stomata

Besonders bei den Genotypen Hozy01 und Hozy10 konnte mit der alkalischen Anilinblau-Färbung zumeist nur eine sehr geringe Anzahl an Zoosporen an den Stomata identifiziert werden. Um nachzuweisen, dass dies nicht an präformierten Resistenzmechanismen wie einer ausgeprägten Wachsschicht, Blattbehaarung oder der verminderten Abgabe von Nonanal liegt, wurde eine Acridinorange-Färbung durchgeführt (Kortekamp & Zyprian, 1999; Dissertation Schröder, 2010).

Acridinorange ist vor allem dafür bekannt Nukleinsäuren anzufärben; als metachromatischer Farbstoff scheint er aber nach Bestrahlung mit UV-Licht auch an polyanionische Biopolymere wie Glykosaminoglykane zu binden. Auch scheint der Farbstoff sich in Vakuolen und Pilzsporen anzusammeln, sodass eine spezifische Färbung von Glykosaminoglykanen erreicht werden kann (Wilson *et al*., 1978; Kortekamp, 2005). Hayat beschrieb zudem 1993, dass spezifische Färbungen von Glykosaminoglykanen durch niedrige Konzentrationen des Farbstoffs Acridinorange erfolgen können, da Acridinorange eine höhere Affinität zu komplexen Kohlenhydraten als zu Nukleinsäuren hat (Kortekamp, 2005). In Kombination mit Calcofluor white bindet es außerdem besser an Haustorien, als an Hyphen. Die Hyphen werden hingegen spezifisch durch das Calcofluor white angefärbt. Zoosporen zeigten sich bei der Acridinorange-Färbung unter Nutzung des GFP-Filters als gelbe, runde Körper an den Stomata. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen innerhalb der ersten zwei Stunden nach Inokulation festgestellt werden. Dieser Befund stärkt die Hypothese, dass die Resistenzmechanismen bei den homozygoten *Rpv12*-trägern zwischen 6 und 24 hpi eingreifen (vgl. 4.1.1). Die Möglichkeit, dass es sich beim *Rpv12*-Locus um einen präformierten Resistenzmechanismus handeln könnte, konnte widerlegt werden (vgl. Kortekamp & Zyprian, 1999; Dissertation Schröder, 2010). Auch Terpene, wie sie in der Dissertation von Akaberi beschrieben wurden, scheinen keine Rolle im Abwehrprozess von *Rpv12*-Trägern einzunehmen (Dissertation Akaberi, 2016).

4.1.3 Zur Frage der Kalloseakkumulation in *Rpv12*-tragenden Genotypen

Es wurde häufig beschrieben, dass der Wirtsorganismus nach Eindringen des Pathogens in das Wirtsgewebe Abwehrbarrieren errichtet. Speziell an Appressorien und Haustorien wurde mehrfach eine Akkumulation verschiedener Substanzen dokumentiert, von Kallose, Cellulose, Pektin, Silicium, über phenolische Verbindungen, antimikrobielle Peptide, toxische Sekundärmetabolite bis hin zu reaktiven Sauerstoffspezies (Kortekamp *et al.*, 1997; Fellbrich *et al.*, 2002; Torres *et al*., 2006; Dong *et al*., 2008; Ton *et al*., 2009; Eulgem *et a*l., 2011; Luna *et al*., 2011; Caillaud *et al.*, 2012; Caillaud *et al*., 2014). Einige Substanzen wie Kallose, Lignin, Suberin, Cellulose und reaktive Sauerstoffspezies (H_2O_2 und $O_2^{\bullet-}$) können mittels mikroskopischer Untersuchungen nachgewiesen werden.

Es gibt einige Publikationen, die Kallose in Zusammenhang mit der pflanzlichen Abwehr bringen. Yu *et al.* beschrieben 2012, dass die resistenten Wildarten *M. rotundifolia* `Carlos´, *V. pseudoreticulata* 1057/1058, *V. amurensis* `Shuanghong´ und *V. amurensis* `Zuoshanyi´ bei Infektion durch *P. viticola* Kallose bilden. In diesen Arbeiten wurde jedoch ausschließlich eine alkalische Anilinblau-Färbung durchgeführt. Hood & Shew beschrieben 1996 hingegen, dass Anilinblau ausschließlich ohne KOH-Vorbehandlung Kallose anfärbt und dieser Farbstoff unter alkalischen Bedingungen das Myzel des Oomyceten anfärbt. Auch für die Rebsorte `Solaris´, welche eine Rückkreuzung der asiatischen Wildrebe *V. amurensis* ist, wurde der Kallose eine Rolle in der Pflanzenabwehr zugeschrieben (Gindro *et al.*, 2003). Dies konnte jedoch 2011 durch Schwander, welcher im Rahmen seiner Dissertation den *Rpv10* Locus auf `Solaris´ identifizierte, nicht bestätigt werden. In den hier durchgeführten Arbeiten wurden im Rahmen der Untersuchung zur Rolle von Kallose zwei Färbungen durchgeführt. Zum einen wurde die Kallose-Färbung mit Anilinblau verwendet, zum anderen die Färbung mit Resorcin. Beide Stoffe färbten zwar Strukturen der Blattproben an und entsprechen sich im Erscheinungsbild, jedoch können sie nicht mit bisher publizierten Abbildungen in Einklang gebracht werden. Dies mag zum einen an der verwendeten Vergrößerung liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine 100-fache Vergrößerung gewählt. In einer Publikation zur Quantifizierung von Kallosebildung (Zhou *et al*., 2012) wurden hingegen ganze Blätter analysiert. Zum anderen aber auch an der uneindeutigen Beschreibung der Kallose-Ablagerungen im Vergleich verschiedener Publikationen. Verschiedene Artefakte, die beispielsweise in Yu *et al.* 2012 beschrieben wurden, konnten auch in der vorliegenden Arbeit (Daten nicht gezeigt) dokumentiert werden, aber nicht mit den Eigenschaften bestimmter Resistenzträger in Einklang gebracht werden. Kortekamp *et al.* beschrieben 1997, dass die Bildung von Kallose in den Rebsorten `Orion´ und

`Phoenix´ (beide tragen *Rpv3.1*, *Ren3*, *Ren9*) erst nach fünf Tagen zu dokumentieren ist.

Auch methodische Unterschiede könnten prinzipiell eine Rolle spielen. Beispielsweise beschrieben Caillaud *et al.* 2014 eine Druckinfiltration zur Durchführung ihrer Versuche. Und auch die chemischen Zusammensetzungen der Färbelösungen weichen voneinander ab. Außerdem wurde bereits 1976 durch Aist *et al.* beschrieben, dass zwar einiges der bekannten Arbeit zur Kallose auf der Anilinblau-Färbung basiert, aber zu bezweifeln ist, dass dieser Test alleine eine Aussagekraft hat. Um methodische Fehler auszuschließen, wurde daher zur Dokumentation der Kallose neben der oft beschriebenen Anilinblau-Färbung auch eine Resorcin-Färbung durchgeführt. Eschrich & Currier beschrieben 1964 die vergleichende Analyse von Anilinblau-Färbung unter Fluoreszenz und Resorcinblau-Färbung im Hellfeld. Dabei weichen sie mit der beschriebenen Färbemethode von der hier verwendeten nach Mulisch & Welsch (2015) ab, indem sie die Konzentration erhöhen und diese Lösung erhitzen. Die behandelte und nach sechs Stunden blau gefärbte Lösung wird dann auf die Probe gegeben, sodass sich die Kallose entsprechend färbt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Blattscheiben mit Ethanol entfärbt und dann für 1 min in Resorcinlösung gefärbt. Die Auswertung erfolgte ebenso wie die der Anilinblau-Färbung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Es wurden zumeist aber auch Hellfeldbilder aufgenommen. Da zwischen den verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72 und 96 hpi) bei der Anilinblau-Färbung kaum Unterschiede zu detektieren waren, erfolgte die Resorcinfärbung nur nach 24 hpi.

Bei der Anilinblau-Färbung können nach 72 hpi grünfluoreszierende Strukturen detektiert werden, die aber als Myzel identifiziert wurden und nicht als Kalloseakkumulation. Allerdings kann auch, unter Voraussetzung der Spezifität der Bindung an Kallose, überlegt werden, ob nicht alle Zellwände, die an das Pathogen angrenzen, mittels Kallose verstärkt sind. Dagegen spricht, dass bei anfälligen Genotypen wie `Italia´ das Myzel bereits nach 48 hpi äußerst stark zu sehen ist.

Zu vermerken ist, dass selbst die *Rpv12*-homozygoten Genotypen Hozy01 und Hozy10 bei der Anilinblau-Färbung zwar nach 48 hpi keine Kallosedeposition jedoch eine deutlich zu dokumentierende Nekrose aufweisen. Auch andere *Rpv12*-tragende Genotypen wie 2014-099-0003, `Kunbarat´, `Kunleany´ und 65-153-18 zeigen diese Nekrosen.

Generell empfiehlt sich für weitere Arbeiten eine ergänzende Färbung bspw. mit Calcofluor white, um die Infektionslast in Einklang mit der Kallosebildung zu bringen.

Dennoch gilt eine Assoziation der Kallosebildung mit dem *Rpv12*-Locus als unwahrscheinlich. Auf den neun analysierten Genotypen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund und diversen Resistenzloci (*Run1/Rpv1, Rpv3.1*, *Rpv12*, *Rcg1*, *Ren3*, *Ren9*) konnte keine Verbindung zu einer *P. viticola* induzierten Kallosebildung in Abhängigkeit des *Rpv12*-Locus dokumentiert werden.

4.1.4 Keine differentielle Lignin- und Suberinakkumulation in *Rpv12*-tragenden Genotypen

Nach Cellulose ist vor allem Lignin in den Zellwänden von Pflanzen vertreten. Es ist essenziell für die Struktur und Stabilität der pflanzlichen Zellwand (Bacic *et al*., 1988; Boerjan *et al*., 2003). In verschiedenen Arbeiten wurde auf molekularbiologischer Ebene unter anderem mittels RNAi-Technologie bei *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* die Akkumulation von Lignin als Pflanzenabwehr-Mechanismus beschrieben (Bhuiyan *et al.*, 2009). Basierend auf Ursache *et al.*, 2018, wurde in dieser Arbeit die Akkumulation von Lignin in den Zellwänden mittels Auramin O-Färbung analysiert. Auramin O gilt als Farbstoff für die Stoffe Lignin und Suberin. Suberin ist ein komplexer Polyester, der auf Glycerin und langkettigen α-, ω-Disäuren und ω-Hydroxysäuren basiert. Dieses Biopolymer bildet eine Barriere zwischen Pflanzen und ihrer Umwelt (Graça & Pereira, 1997; Graça & Santos, 2007).

Mittels der Auramin O-Färbung konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen anfälligen und resistenten Genotypen beschrieben werden. Dai *et al.* beschrieben 1995 eine Ligninakkumulation erst 15 Tage nach Inokulation. Deutlich zeigten sich hingegen nekrotische Höfe bei den Resistenz-tragenden Genotypen. Zur Absicherung der erfolgreichen Infektion wurden die bereits analysierten Proben zusätzlich mit *Calcofluor white* angefärbt, da die Zoosporen nicht durch die Auramin O-Färbung detektiert werden konnten. Deutlich zu sehen war dadurch die Enzystierung von Zoosporen an den Stomata. Allerdings ist nicht um jedes Stoma ein nekrotischer Hof zu sehen. Dies kann zunächst am frühen Zeitpunkt (24 hpi) liegen. Möglicherweise ist die Abwehr nicht an allen Zellen gleich schnell. Zum anderen könnte es ein wichtiger Faktor sein, dass in dieser Arbeit keine Einzelsporisolate sondern stets Gemische aus dem Freiland (oder deren Nachzuchten) verwendet wurden. Es ist daher möglich, dass einige Zoosporen über verschiedenartige, unterschiedlich stark perzipierte Effektoren verfügen. Die Diversität der Sporangien aus dem Freiland zeigt sich in verschiedenen Studien. Beispielsweise konnte zwischen den Jahren 2000 und 2004 die Häufigkeit der gegen

Chinon-haltige Fungizide resistente *Plasmopara*-Proben in Europa bei 0-23% ermittelt werden (Corio-Costet *et al*., 2010).

Auf mikroskopischer Ebene konnten zwischen den verschiedenen Resistenzträgern keine Unterschiede auf Basis einer Lignin- und/oder Suberinakkumulation dokumentiert werden.

4.1.5 Reaktive Sauerstoffspezies in resistenten Genotypen

Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen wurde schon häufig bei Pflanzen beschrieben (Auh & Murphy, 1995; O'Brien *et al.*, 2012).

Bereits 1983 konnte Doke Auswirkungen des Moleküls $O_2^{\bullet -}$ auf die Interaktion zwischen *Phytophthora infestans* und *Solanum tuberosum* dokumentieren (Lehmann *et al.*, 2015). Dabei sind ROS nicht nur bei der Aktivierung von Pflanzenabwehr-Genen essenziell, sondern dienen als Signal-Moleküle und sind für die Vernetzung von Polysacchariden wie Lignin und Glykoproteinen relevant, wodurch die Zellwände des Wirts verstärkt werden (Bradley *et al.*, 1992; Levine *et al.*, 1994; Lamb & Dixon, 1997; Torres *et al.*, 2006). Über ein Alleinstellungsmerkmal unter den ROS verfügt dabei Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Es ist fettlöslich und kann biologische Membranen passieren; kombiniert mit seiner verhältnismäßig geringen Reaktivität bildet es somit ein wichtiges Signal-Molekül (Bowler *et al.*, 1992; Laloi *et al.*, 2007; Mittler *et al.*, 2004; Slesak *et al*., 2007; Šnyrychová *et al.*, 2009). In Pflanzen spielt H_2O_2 neben der Lignifikation, der Zellwandstärkung durch Quervernetzungen von Glykoproteinen, auch eine wichtige Rolle in der Hypersensitiven Reaktion (Bradley *et al*., 1992; Lamb & Dixon, 1997; Torres *et al*., 2006).

H_2O_2 ist eine nicht-radikalische reaktive Sauerstoffspezies, die durch eine zwei-Elektron Reduktion von molekularem Sauerstoff entsteht. Die hauptsächliche Quelle ist die enzymatische oder auch spontane Dismutation von Superoxidradikalen. Dabei induziert eine Superoxid-Dismutase (SOD) die Katalyse von $O_2^{\bullet -}$ und $HO_2^{\bullet}$ zu H_2O_2 (Baker & Orlandi,1995). Es sind verschiedene *in vivo* Quellen für H_2O_2 beschrieben. Dazu zählen Organellen wie Mitochondrien, Peroxisomen und Chloroplasten, die apoplastische Region und die Plasmamembran, so wie Zellwand-assoziierte Enzyme wie verschiedene NADPH-Oxidasen und -Peroxidasen (Asada, 1999; Šnyrychová *et al.*, 2009).

Zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (H_2O_2 und $O_2^{\bullet -}$) wurden Färbungen mit DAB und NBT durchgeführt. DAB reagiert mit H_2O_2 und zeigt dann eine braune Färbung (Thordal-Christensen *et al*., 1997). NBT hingegen reagiert mit $O_2^{\bullet -}$ und färbt Gewebe mit

hoher $O_2^{\bullet-}$-Konzentration blau (Kumar *et al*., 2014). Bei Reduktion des NBTs durch H_2O_2 tritt aber auch bei diesem Farbstoff eine braune Färbung auf (Wohlrab & Fuchs, 1967). Bei den *Rpv12*-Trägern konnten bereits nach 24 hpi mit beiden Färbungen braune Läsionen detektiert werden. Bei der NBT-Färbung konnte zudem ein blauer Wundrand an den untersuchten Explantaten festgestellt werden, sodass der Erfolg der Färbung sichergestellt war. Für die DAB-Färbung wurden auch ungefärbte Blattscheiben als Kontrollen mitgeführt, auf welchen auch braune Läsionen, wenn auch in deutlich schwächerer Ausprägung, zu sehen waren. Eindeutig festzustellen ist jedoch, dass $O_2^{\bullet-}$ bei der Infektionsabwehr bei *Rpv12*-Trägern nicht auftritt, während es bei Verletzungen deutlich zu beobachten ist. Alternativ wurden von Šnyrychová *et al.* (2009) verschiedene Farbstoffe beschrieben, welche für die Detektion von ROS in unterschiedlichen Pflanzengeweben genutzt werden könnten. Lehmann *et al.* (2015) führen bspw. Dihydroethidium für die Fluoreszenzmikroskopie von $O_2^{\bullet-}$-Akkumulation auf. Ob diese Stoffe oder andere Methoden bessere Erkenntnisse bringen, muss überprüft werden. Bei mikroskopischen Analysen sind vor allem DAB- und NBT-Färbungen in Publikationen vertreten (vgl. Faoro & Iriti, 2009; Bournonville & Díaz-Ricci, 2011).

Ergänzend zu den Farbstoffen DAB und NBT wurde eine Färbung mit Dichlor-Fluorescin-Diacetat (DCFDA) entsprechend Müller (Masterarbeit, 2014) durchgeführt. Diese Färbung erfolgte aus Zeitgründen jedoch nur einmalig und zeigte zunächst keine nennenswerten Effekte. Bei Nutzung von DCFDA hätte eine grüne Fluoreszenz im Umfeld infizierter Spaltöffnungen detektierbar sein sollen, da das DCFDA unter Einfluss von ROS zum fluoreszierenden Dichlor-Fluorescein oxidiert wird.

Auf Grundlage dieser Studien lässt sich zusammenfassen, dass ROS bei *Rpv12*-Trägern eine Rolle in der Abwehr des Pathogens *P. viticola* spielen. Dies wird durch die 2020 erschienene Studie von Chitarrini *et al.* gestützt, auch sie kommen auf Transkriptions- und Metabolom-Ebene zu dem Schluss, dass im *Rpv12*-Locus reaktive Sauerstoffspezies und Salicyclsäure eine zentrale Rolle einnehmen. Hier scheint jedoch H_2O_2 eine vorherrschende Rolle einzunehmen.

4.1.6 Myzelwachstum bei *Rpv12*-tragenden Genotypen um die Hälfte reduziert

Zumeist wird die Widerstandsfähigkeit unterschiedlicher Rebsorten anhand des OIV-Deskriptors 452 und 452-1 beschrieben (franz. *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin;* Maul *et al*., 2021). Da sich der Zeitpunkt der Aktivierung von Abwehrmechanismen aber besser am Myzel bestimmen lässt, wurde eine vergleichende Myzelanalyse mit alkalischen Anilinblau-Färbungen durchgeführt. Dafür wurden pro Genotyp 45 mikroskopische Bilder (bei Hozy10 ist eine Blattscheibe ausgefallen, weshalb hier nur 40 Bilder als Grundlage dienten) bearbeitet und mittels Fiji analysiert. Eine ähnliche Methode wurde bereits 2009 bei Jürges *et al.* zur Charakterisierung verschiedener *Vitis*-Arten eingesetzt und war nicht auf die damit assoziierten Resistenzloci ausgerichtet. Auch Fröbel führte 2019 im Rahmen ihrer Dissertation eine Myzel-Studie durch.

Die Genotypen `Afus Ali´ und `Italia´ dienten in der vorliegenden Versuchsreihe als anfällige Referenz. Dabei war bei `Afus Ali´ eine starke Streuung der Intensität des Myzelwachstums zu vermerken, was möglicherweise auf unterschiedliche Blattbeschaffenheiten zurückzuführen ist. Gleiches gilt auch für den *Rpv12*-Träger `Kunleany´. Wobei bei `Kunleany´ in folgenden Marker-Analysen festgestellt wurde, dass sich eine Pflanze des *Rpv10*-Trägers `Solaris´ unter den `Kunleany´s fand, dessen Abwehr laut Fröbel (Dissertation, 2019) sein Maximum der pflanzlichen Immunantwort nach dem vierten Tag hat. Der Genotyp `Kunbarat´, der die gleichen Resistenzloci wie der Genotyp 65-153-18 trägt (*Rcg1* und *Rpv12*), weist auch ein ähnlich stark vermindertes Myzelwachstum wie dieser auf. Der Genotyp 2014-099-0003 (*Rpv12*, *Rcg1*, *Ren3*, *Ren9*), der Kreuzungsprodukt aus 65-153-18 (*Rpv12*, *Rcg1*) und 2004-043-0021 (*Rpv1*, *Rpv3.1*, *Run1*, *Ren3*, *Ren9*) ist, hat hingegen ein im Vergleich zu 65-153-18 vermindertes Myzelwachstum, aber ein deutlich stärkeres Myzelwachstum als der maternale Genotyp 2004-043-0021. Obwohl 2014-099-0003 mit *Rpv12* nur einen bekannten Resistenzlocus gegen *P. viticola* trägt, scheint der Einfluss auf das Myzelwachstum stärker zu sein als bei den Genotypen `Kunbarat´ und 65-153-18. Dies könnte damit begründet werden, dass die *Rpv*-Loci, wie im Falle von 2014-099-0003, durch die *Ren*-Loci *Ren3* und *Ren9* verstärkt werden, dafür gibt es bisher jedoch keine Daten. Da zu den Locus-assoziierten Resistenzeigenschaften nicht nur die frühe Identifikation von Pathogenen durch Resistenzgene, sondern auch Transkriptionsfaktoren und die Produktion von ROS, Phytoalexinen oder phenolischen Verbindungen gehört, könnte eine Verstärkung der Resistenz durch Pyramidisierung möglich sein.

Auch ist es möglich, dass bis dato noch unerkannte minor QTLs vererbt wurden, welche zur Resistenz gegen *P. viticola* beitragen. Foria *et al.* beschrieben 2017, dass auch der genetische Hintergrund der Rebe einen Einfluss auf die Abwehr hat. So könnte im Falle von 2014-099-0003 genetischer Hintergrund von 2004-043-0021 Auswirkungen auf den Nachkommen haben. Davon abgesehen, gibt es auch sogenannte epistatische Effekte. Dies ist eine Form der Gen-Interaktion und beschreibt in Bezug auf QTLs die mögliche Überlagerung verschiedener QTLs untereinander (Laurie *et al.*, 2014; Jannink & Jansen, 2001).

Besonders auffällig ist das Myzelwachstum der im *Rpv12*-Locus homozygoten Genotypen Hozy01 und Hozy10. Hier ist nahezu kein Myzelwachstum in allen Proben festzustellen. Das nachweisbare Myzelwachstum macht bei Hozy01 (*Rpv12* +/+) nur etwa 1 % der mikroskopischen Aufnahmen aus, während es bei Hozy10 (*Rpv3.1* +/+ und *Rpv12* +/+) bei etwa 0,5 % liegt. Hier ist allerdings anzumerken, dass auch der parentale Genotyp IRZ0973 auf Grund seiner Resistenzloci *Rpv3.1* und *Rpv12* ein geringes Myzelwachstum aufweist. Auch hier liegen eventuell Einflussfaktoren aus dem genetischen Hintergrund vor (Foria *et al.*, 2017). Dennoch scheint sich die Verstärkung der Resistenz von *Rpv12* durch *Rpv3*, wie sie bereits bei Venuti *et al.* (2013) und Eisenmann (Dissertation, 2019) beschrieben wurde, auch bei den homozygoten Genotypen zu bestätigen. Der Genotyp Hozy10 bietet sich entsprechend für züchterische Maßnahmen als Resistenzträger an.

Im Rahmen der CAPS-Analyse mit Markern von Dr. Ian Dry (CSIRO, Australien) wurde eine Selbstung von `Kunbarat´ erstellt, welche zu 29 Genotypen führte. Dabei trugen fünf der Genotypen keinen *Rpv12*-Locus. Bei 14 Genotypen zeigte sich ein verhältnismäßig starkes Myzelwachstum im Vergleich zu zehn Genotypen mit einem stark verringerten Myzelwachstum. Elf der analysierten *Rpv12*-Träger waren im Locus homozygot, basierend auf den Markern UDV-350, UDV-343, UDV-340, UDV-360, UDV-370, VMC2H12 und GF14-52. Ein weiterer Genotyp war im Marker UDV-370 homozygot. Insgesamt zeigten von den elf *Rpv12*-Homozygoten sieben Genotypen eine starke Inhibition des Myzelwachstums von *P. viticola.* Bei zwei weiteren homozygoten Genotypen konnten makroskopisch kaum Sporangiophoren dokumentiert werden.

Daraus ist abzuleiten, dass die Homozygotie einen Einfluss auf das Myzelwachstum haben kann, aber nicht muss. Ob dies spezifisch für *Rpv12* gilt , kann auf diesem Weg nicht abschließend geklärt werden. Ein eventueller Einfluss durch den *Rcg1*-Locus auf das Myzelwachstum konnte in diesem Versuchsaufbau nicht nachgewiesen werden. Hierfür sind weitere Analysen im größeren Umfang nötig. Insgesamt gibt es wenig Daten

zum Einfluss von Homozygotie eines Resistenzlocus auf die Resistenzeigenschaften. Dies kann teilweise mit der oft stark ausgeprägten Inzuchtdepression begründet werden, welche bei Reben häufig zu beobachten ist (Alleweldt & Possingham, 1988; Töpfer *et al.*, 2011b). Dry *et al.* beschrieben 2017, dass bei Homozygotie des *Ren4*-Locus gegen *Erysiphe necator* der programmierte Zelltod etwas schneller eintritt, als bei den heterozygoten Genotypen.

4.1.7 Zusammenfassung mikroskopischer Erkenntnisse

Basierend auf den Erkenntnissen kann festgehalten werden, dass die Pathogenabwehr sehr früh nach der Penetration eintritt. Bei heterozygot *Rpv12*-tragenden Genotypen konnte eine deutliche Verminderung des Myzelwachstums im Vergleich zu anfälligen Rebsorten innerhalb der ersten 48 hpi dokumentiert werden. Deutlich zeigte sich die verstärkte Formierung von Haustorien im Vergleich zu den anfälligen Rebsorten `Italia´ und `Afus Ali´. Bei den homozygoten Genotypen Hozy01 und Hozy10 konnte eine besonders starke Verminderung der enzystierenden Zoosporen innerhalb der ersten 24 Stunden dokumentiert werden. Auch konnte bei Hozy01 (*Rpv12*$^{+}$/*Rpv12*$^{+}$) eine ähnlich starke Unterdrückung des Myzelwachstums wie bei der parentalen Rebe IRZ0973 (*Rpv3.1*$^{+}$/*Rpv12*$^{+}$) beobachtet werden. Mittels Acridin orange-Färbung konnte gezeigt werden, dass die Zoosporen bei allen Genotypen die Stomata erreichen, weshalb es sich um eine post Penetrations-Abwehr handelt. Es konnte bei der Pathogenabwehr kein differentieller Einfluss von Kallose dokumentiert werden. Deutlich zeigten sich jedoch bereits nach 24 hpi bei verschiedenen Färbungen braune Läsionen. Sowohl bei Färbungen mit Auramin O, als auch mit Resorcin konnte vor allem bei dem Genotypen 2014-099-0003 Läsionen, die auf eine HR hindeuten, identifiziert werden. Diese Annahme konnten mittels DAB-Färbung und NBT-Färbung gestützt werden, wobei Kontrollen ohne Farbstoff ähnliche Läsionen zeigten, wenn auch weniger stark ausgeprägt. Auch Chitarrini *et al.* beschrieben 2020 in ihrer Transkriptom-Analyse unterstützt durch GC/MS, UPLC und UHPLC, dass der *Rpv12*-vermittelte Abwehrmechanimus Merkmale einer ROS- abhängigen HR zeigt.

4.2 Genetik und molekulare Untersuchung des *Rpv12*-Locus

4.2.1 Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS)-Marker-Analyse im *Rpv12*-Locus

Zu dem 2013 durch Venuti *et al.* identifizierten Resistenzlocus *Rpv12* sind bisher keine Sequenzdaten veröffentlicht. Umso wichtiger ist es, spezifische Marker zur Identifikation des *Rpv12*-Locus zu entwickeln, um die Züchtung bei der MAS und Generierung pyramidisierter Genotypen zu fördern. Durch einen persönlichen Kontakt konnte eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Ian Dry des CSIRO (engl. *Commonwealth Scientific and Research Organisation*) geschlossen werden. In Zusammenarbeit mit Dr. Ling Yin (Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, China), hatten sie ein *whole genome sequencing* durchgeführt und die zwei Haplotypen des sequenzierten Genotyps, der den Locus *Rpv12* tragen soll, miteinander verglichen. Im Rahmen dieser Kooperation wurden der Arbeitsgruppe Zyprian des Julius Kühn-Instituts, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, sieben Sequenzen zur CAPS-Marker-Analyse zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden damit über 200 *Rpv12*-tragende Genotypen mittels CAPS-Marker-Analyse (Restriktion von Amplifikaten) oder PCR mittels SNP-spezifischer Polymerase überprüft. Dabei zeigten nur vier der sieben CAPS-Marker differentielle Restriktionsmuster, welche nur bedingt den Erwartungen auf Basis der zur Verfügung gestellten Sequenzen entsprachen. Nach Klonierung und Sequenzierung verschiedener Fragmente aus unterschiedlichen *Rpv12*-Trägern (`Kunbarat´, `Kunleany´, 2014-099-0003, 65-153-18) zeigten sich vier SNPs auf den unterschiedlichen Haplotypen: SNP_976, SNP_983, SNP_987, SNP_988. Während auf den bis dato getesteten Genotypen keine Korrelation der SNPs zur Resistenz festgestellt werden konnte, gelang dies jedoch auf Basis einer `Kunbarat´-Selbstung. Bei Anwendung der CAPS-Marker auf den `Kunbarat´-Selbstungslinien konnten Unterschiede bei den SNPs identifiziert werden. Bei einigen Markern konnte allerdings auch nach mehreren Durchläufen nicht vollkommen sicher gesagt werden, ob beide SNPs vorhanden sind oder nicht. Häufig war ein Allel aber deutlich stärker zu sehen als das andere. Der Marker, der möglicherweise Resistenz-assoziiert sein könnte, ist SNP_988. Wenn das A-Allel fehlt, ist eine hohe Anfälligkeit gegeben und zumeist auch kein *Rpv12*-Locus vorhanden. Mittels Pearson-Korrelation konnte ein linearer Zusammenhang zwischen dem SNP_988-A-Allel und einer starken Abwehr, sowie ein linearer Zusammenhang zwischen dem SNP_988-T-Allel mit einer schwachen Abwehr nachgewiesen werden. Jedoch konnte auch bei SNP_983-G eine geringe lineare Korrelation zur starken Abwehr

nachgewiesen werden, diese fällt allerdings, je nach verrechneter Daten (mikroskopische Aufnahmen oder Blattbonitur), unterschiedlich stark aus. Davon abgesehen ist der SNP mit der G-Variante dem anfälligen Allel zugeordnet. Daher gilt es sich auf den SNP_988 zu konzentrieren. Der Marker SNP_988 liegt ~67.287 bp vom nächstmöglichen *CC-NLR*-Gen entfernt. Auf Basis von FGeneSH-Genvorhersagen, auf dem Haplotyp Gf9918, konnte jedoch in der Region des SNPs ein Gen identifiziert werden, welches eine Serin/Threonin-Protein-Phosphatase des Typs PP1 trägt. Bereits 1967 wurde durch Moore & Perez die Proteingruppe 14-3-3, die Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen der Typen PP1 und PP2A als wichtige Regulatoren der Bindungs-Interaktionen enthält, entdeckt (DeLille *et al*., 2001). Seit der Entdeckung der 14-3-3-Proteine konnte eine Vielzahl an Einflüssen der Proteine dieser Gruppe auf die Zelle identifiziert werden. Sie beeinflussen den Stoffwechsel, die Signaltrandsduktion, Transkription, Stressantworten und damit verbunden auch die Apoptose (Dougherty & Morrison, 2004). Sie spielen eine zentrale Rolle bei Signalwegen der Immunabwehr, welche mit PTI und ETI assoziiert sind (Bigeard *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2015; Dubrow *et al.*, 2018). Diesem hypothetischen Gen kann entsprechend eine relevante Aufgabe bei der Immunreaktion gegen *P. viticola* zugeschrieben werden.

Für die Züchtung könnte hiermit ein eng-gekoppelter Marker zur Identifikation von *Rpv12*-tragenden Genotypen gefunden sein, welcher dank der Möglichkeit als CAPS-Marker genutzt zu werden oder mittels der Genaxxon SNP-Polymerase spezifisch amplifiziert zu werden, nur minimaler Gerätschaften bedarf, welche in den meisten Laboratorien zur Verfügung stehen.

4.2.2 Vererbung des *Rpv12* Locus und Sequenzierung eines *Rpv12*-tragenden Genotyps

Der Resistenzlocus *Rpv12* entstammt der asiatischen Wildrebe *V. amurensis*. Mittels Abstammungsanalyse konnten einige Fehler im bisherigen Stammbaum *Rpv12*-tragender Rebsorten aufgedeckt und behoben werden. So konnte auf Basis der Analyse mit 81 SSR-Markern `Kunbarat´ (Ungarn, 1960) als volles Geschwister von `Kunleany´ (Ungarn, 1960) und die Rebsorte `Afus Ali´ (Libanon) statt `Italia´ (Italien, 1911) als parentale Rebsorte identifiziert werden. Auch die Abstammung von `Petra´ musste korrigiert werden. Statt `Pinot Noir´ (Frankreich) zeigte sich die Rebsorte `Savagnin blanc´ (Herkunft unbekannt) als parentaler Genotyp (Müllner *et al.*, 2020; Maul *et al.*, 2021).

In Venuti *et al.* (2013) wird eine Akzession mit der Bezeichnung „*Vitis amurensis* NT10“ geführt, welche neben der nachgewiesenen Rebsorte `Afus Ali´ als parentaler Genotyp der Rebsorten `Kunbarat´ und `Kunleany´ in Frage kommt. Für die ursprüngliche Rebe *V. amurensis* wird auf Basis der Daten aus 96 SSR-Markern vermutet, dass sie sowohl *Rpv12* als auch *Rpv10* trug. Dies wurde durch Venuti *et al.* 2013 gezeigt, welche die beiden Rebsorten `Zarja severa´ (*Rpv12*) und `Severnyi´ (*Rpv10*) als Vollgeschwister identifizierten. Für die vorliegende Arbeit wurden nur Nachkommen einer Kreuzung aus Ungarn verwendet. Die interspezifischen Kreuzungen von Koleda, die 1975 vorgenommen wurden, wurden mit den Zuchtnummern 28/19 und 4/15 bezeichnet. Während aus der Kreuzung 28/19 die Sorten `Kunbarat´ und `Kunleany´ sowie ihre Nachkommen wie `Lela´, `Rani Rizling´, `Petra´, `Zlata´ und `Mila´ hervorgingen, sind für den Genotypen 65-153-18, welcher aus der interspezifischen Kreuzung 4/15 x Lemberger hervorging, bisher keine Sorten bekannt. Dennoch wurde der Genotyp 65-153-18 im Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof für viele züchterische Ansätze zur Pyramidisierung verwendet. Unter anderem wurde dieser Genotyp, der die Resistenzloci *Rpv12* und *Rcg1* trägt, mit 2004-043-0021 gekreuzt. 2004-043-0021 ist eine Kreuzung aus `Calandro´ (Regent (*Ren3*, *Ren9, Rpv3.1*) x `Domina´) und VRH3082-1-49 (*Run1*/*Rpv1*), einer *Muscadinia*-Rückkreuzung von Alain Bouquet, deren Ursprünge auf die Kreuzung North Carolina 6- 15 (Malaga Seedling 1 x *Muscadinia Rotundifolia* G52, L. R. Detjen) aus dem Jahr 1916 zurückgehen (Maul *et al.*, 2021). Das Kreuzungsprodukt 2014-099-0003 trägt die Resistenzloci *Ren3*, *Ren9*, *Rpv12* und *Rcg1*. Bei einer vergleichenden Analyse der Myzelentwicklung in diesem Genotyp konnte eine hohe Abwehr gegenüber *P. viticola* beobachtet werden. Sie zeigte sich durch frühe Nekrosen und vermindertes Myzelwachstum sowie starke Ausbildung von Haustorien. Auf Grund der ausgeprägten Widerstandskraft dieses Genotyps wurden er (2014-099-0003, SMRT) sowie seine Parentaltypen (2004-043-0021 und 65-153-18, Illumina) sequenziert und ein *de novo*-Assembly mittels Trio Binning durch das CeBiTec Bielefeld durchgeführt (Koren *et al*., 2018). Dadurch konnten die zwei parentalen Haplotypen differenziert und die Loci identifiziert werden. Für den *Rpv12*-Locus, der gemäß Venuti *et al.* 2013 mit den Markern UDV-350 und UDV-370 eng eingegrenzt werden konnte, zeigten sich starke Unterschiede in der Größe des Locus zwischen den beiden verschiedenen Haplotypen und im Vergleich zum Referenzgenom PN40024 12X.v2. Der Locus umfasst auf PN40024 12X.v2 eine Länge von 1.146.561 bp, bei dem Haplotyp Gf9921 eine Länge von 1.012.210 bp und bei dem Haplotyp Gf9918 eine Länge von 780.888 bp. Dieser Größenunterschied schlägt sich auch in den *NLR*-Genen nieder. Während auf dem Referenzgenom PN40024 12X.v2 zwölf *NLR*-Gene in bioinformatischen Vorhersagen

identifiziert werden konnten, wurden auf dem Haplotyp Gf9918 nur vier Gene mit NB-ARC-Domäne gefunden, von denen nach Genvorhersage durch FGeneSH, nur zwei vollständig sind und die drei Domänen CC, NB-ARC und LRR aufweisen.

Die *NLR*-Gene bilden die größte Klasse der bekannten Resistenzgene im Pflanzenreich (Dangl & Jones, 2001; Hulbert *et al*., 2001; Wei *et al*., 2020). Während die LRR-Domäne Protein-Protein-Interaktionen eingeht, wodurch sie als Detektor pathogenspezifischer Effektoren eine entscheidende Rolle einnimmt, bindet und hydrolysiert die NBS-Domäne ATP oder GTP (Van der Biezen & Jones, 1998; Lukasik & Takken, 2009; Meyers *et al*., 1999; Wei *et al.*, 2020). Die Proteine sind intrazellulär lokalisiert und werden bei Kontakt mit Pathogenen durch die Elicitoren aktiviert. Es folgt eine Phosphorylierungskaskade und die Aktivierung von MAPK-Kaskaden (engl. *mitogen-activated protein kinases*), welche mit Transkriptionsfaktoren interagieren und somit eine differentielle Transkription erwirken. Beispielsweise interagieren die MAPKs MPK3 und MPK6 von *Arabidopsis* mit dem WRKY-Transkriptionsfaktor WRKY33, sie phophorylieren ihn, um die Transkription zu regulieren (Mao *et al*., 2011; Li *et al*., 2012; Cui *et al*., 2015). Die Rolle des WRKY33 Transkriptionsfaktors bei der Regulation von Abwehrmechanismen konnte auch bei der Interaktion zwischen Weinrebe (`Regent´) und *P. viticola* nachgewiesen werden (Merz *et al*., 2015).

Die durch die Resistenzproteine induzierte ETI führt typischerweise zur Aktivierung der hypersensitiven Reaktion, wie sie auch in den makro- und mikroskopischen Analysen dokumentiert werden konnte (Qi *et al*., 2012). Die Rolle der CC-Domäne, welche häufig in Kombination mit NLR-Domänen auftritt, aber auch durch TIR (Toll/Interleukin-1 receptor) ersetzt sein kann, ist noch nicht abschließend geklärt. In verschiedenen Arbeiten konnten jedoch Hinweise darauf gefunden werden, dass die CC-Domäne zur Protein-Protein-Interaktion beiträgt (Nooren *et al*., 1999; Liu *et al*., 2007; Wei *et al.*, 2020). Die Detektion des Effektors führt zur Konformationsänderung im NLR-Protein, welche Domänen-Umstrukturierung der LRR-Domäne und deren Oligomerisierungen umfassen kann. Über Nukleotidaustausch an der NB-ARC-Domäne (ADP für ATP) werden Effektordetektionen weitergeleitet (Takken & Goverse, 2012). Fehlen Teile der Domänen oder die vollständigen Domänen in der codierenden Sequenz eines Gens, kann das Gen in seiner Funktionalität eingeschränkt sein (Dinesh-Kumar *et al*., 2000).

Mittels BLAST und Alignments wurden die *CC-NLR*-Gene des Haplotypen Gf9918 mit dem Haplotyp Gf9921, sowie dem Referenzgenom PN4024 12X.v2 auf Nukleotid- und Aminosäurenebene verglichen. Auf dem Referenzgenom fanden sich ähnliche Gene wie in den Haplotypen des *Rpv12* Trägers. Das Gen #1 ähnelt dem Gen *Vitvi14g02706*, #2 entspricht eher *Vitvi14g00591* während #3 und #4 am meisten Übereinstimmungen mit

Vitvi14g02729 aufweisen. Auf Nukleotidebene konnten nicht nur SNPs sondern auch Triplett- und InDel-Strukturveränderungen dokumentiert werden. Dies kann auf der Ebene des Proteins zu einem Wegfall von Aminosäuren und/oder einer Verschiebung des Leserasters führen. Daher sind unterschiedliche Eigenschaften der Gene naheliegend.

Nach Auswertung von RNA-Seq-Daten eines nicht infizierten Blattes des Genotyps 2014-099-0003, konnten im Bereich der mittels FGeneSH ermittelten Sequenzfragmente CDS (codierende Sequenzen) zugeordnet werden. Dabei zeigte sich, dass zwei CDS, *Gf9918_14g22616* und *Gf9918_14g22614* auf Gen #1 kartieren. Dabei codiert *Gf9918_14g22616* für eine CC-NB-ARC-Domäne, während *Gf9918_14g22614* für eine LRR-Domäne sowie eine Transmembran-Domäne codiert. Transmembrandomänen in Kombination mit eLRRs (engl. *extra cytoplasmic leucine rich repeats*) wurden bereits als wichtige Proteine in der Induktion von Abwehrproteinen wie PGIPs (engl. *Polygalacturonase inhibiting protein*) beschrieben. Weitere Beispiele stellen die Gene *Cf-2*, *Cf-4* und *Cf-9* dar, welche bei Tomaten eine Resistenz gegen *Cladosporium fulvum* vermitteln. Bei ihnen handelt es sich ebenfalls um *TM-LRR*-Gene (Jones *et al*., 1993; Parniske *et al*., 1997; Thomas *et al*., 1997; Dixon *et al.*, 1996; Kumar *et al*., 2017). Auch Xiao *et al.* beschrieben 2001 ein Protein, RPW8.1, das eine Transmembrandomäne sowie zwei CC-Domänen trägt, als Resistenz-assoziiert (Wang *et al.*, 2009).

Auch auf #2 kartieren zwei CDS. Hier codiert *Gf9918_14g22618* für eine CC-Domäne, während *Gf9918_14g22619* für eine NLR-Domäne codiert. Auf #3 und #4 kartiert jeweils eine CDS für CC-NLR-Domänen: *Gf9918_14g22624* und *Gf9918_14g22626*. Die Unterteilung der Gene in zwei CDS kann auf ein alternatives *Splicing* hinweisen. Es könnte sein, dass diese CDS unter Infektionsbedingungen differentiell transkribiert werden und die CDS, die jeweils einen Teil der Resistenzgen-typischen Domänen tragen, als gemeinsames CDS-Transkript transkribiert werden. Ein solches alternatives Splicing konnte bereits bei Genen des Resistenzlocus *Run1*/*Rpv1* beobachtet werden. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass beide Resistenzgene zu vier verschiedenen Transkripten führen, die sich aus Kombinationen verschiedener Spleißvarianten ergeben (Gassmann, 2008; Feechan *et al*., 2013). Auch könnten miRNAs (engl. *micro*) und siRNAs (engl. *small interfering RNAs*) eine Rolle in der Pathogen-Abwehr spielen. Bereits 2006 konnte durch Brodersen & Voinnet gezeigt werden, dass sie die Transkription und posttranskriptionellen Regulationen beeinflussen. Dabei interagieren miRNAs mit NLR-Motiven und führen zur Produktion von phasiRNAs (engl. *phased, secondary small interfering RNAs*). PhasiRNAs können für regulatorische Effekte

notwendig sein (Fei *et al.*, 2016). Die Rolle von miRNAs in der Pathogenabwehr von Pflanzen konnte 2018 durch Brilli *et al.* bestätigt werden. Beispielsweise induziert eine Behandlung von Arabidopsis mit flg22 die Akkumulation von miR393, welches wiederum auf F-Box-Auxinrezeptoren wie TIR1, AFB2 und AFB3 Einfluss nimmt (Navarro *et al.*, 2006; Fei *et al*., 2016). Diese Unterdrückung der Auxin-Signalübertragung korreliert mit der Verstärkung einer Pflanzenabwehr (Navarro *et al.,* 2006; Fei *et al.*, 2016). Auch bei Sojabohnen konnte bei Infektion mit dem Oomyceten *Phytophthora sojae* eine Hochregulierung von miR393 dokumentiert werden (Wong *et al*. 2014; Fei *et al.*, 2016). Weitere Resistenz-assoziierte Gene im Bereich des Locus bzw. in dessen direkter Umgebung sind möglich. Chitarrini *et al.* zeigten 2020, dass bei Analysen von *Rpv12*-Trägern mittels RNA-Seq, GC/MS, UPLC und UHPLC bei 88 Metaboliten unterschiedliche Konzentrationen nachgewiesen werden konnten und 432 Gene eine differentielle Expression zeigten. Dabei waren die meisten Metabolitveränderungen bei Kohlenhydraten, Fettsäuren und Phenolen festzustellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich aber zunächst, basierend auf Venuti *et al.* (2013) auf NLR-Strukturen konzentriert. Auch Chitarrini *et al.* beschrieben 2020, dass die Abwehrmechanismen von *Rpv12*-Trägern die Merkmale einer NLR-induzierten Abwehr tragen. In Verbindung mit NLR-Strukturen konnten insgesamt sechs CDS-Sequenzen auf vier potenziellen Genen identifiziert werden, die mit den Resistenzeigenschaften des *Rpv12*-Locus assoziiert sein könnten. Nähere Analysen werden im Rahmen einer differentiellen Genexpressionsanalyse und qRT-PCR-Analysen getätigt werden.

4.2.3 Entwicklung neuer SSR-Marker und Vergleich der Loci *Rpv8* und *Rpv12*

Venuti *et al.* (2013) entwickelten für die Identifikation des *Rpv12*-Locus einige Marker, doch nur wenige können für den *Rpv12*-Locus spezifisch genutzt werden. Wie in 4.2.2 beschrieben, weicht der *Rpv12*-Locus stark vom Referenzgenom PN40024 12X.v2 ab, weshalb sich die Entwicklung von spezifischen Markern auf dem Referenzgenom als schwierig erweist. Von den durch Venuti *et al.* 2013 als Resistenz-assoziiert beschriebenen Markern, zeigten sich die Marker UDV-350 (309 bp), UDV-343 (160 bp), UDV-345 (218 bp), UDV-340 (179 bp), UDV-360 (205 bp), UDV-370 (197 bp) als aussagekräftig. Den identifizierten *NLR*-Genen am nächsten liegen davon UDV-340 und UDV-360. Doch UDV-340 liegt etwa 180 kb vom nächsten *NLR*-Gen entfernt, UDV-360 etwa 125 kb. Bereits 2011 wurde durch Blasi *et al.* ein Resistenzlocus auf Chr. 14 identifiziert, als Resistenz-assoziiert wurde der Marker Chr14V015 angegeben, welcher auf dem Referenzgenom PN40024 12X.v2 auf Position Chr.14:6641772 liegt. Auf dem

Haplotyp Gf9918 hingegen liegt der Marker auf Position Gf9918_Chr14:8472861..8473072. Das Resistenz-assoziierte Allel ist 212 bp groß. Sowohl *Rpv8* als auch *Rpv12* wurden auf Nachkommen von *V. amurensis* beschrieben. Zur Klärung einer möglichen Identität der zwei Loci wurden 57 Marker auf Chr. 14 verteilt angewendet und jeweils die möglicherweise Resistenz-assoziierten Allelgrößen der Genotypen `Kunbarat´ und `Kunleany´, sowie einigen der Nachkommen, mit der *Rpv8*-tragenden *V. amurensis* verglichen.
Von den 57 Markern waren 13 aus verschiedenen Gründen nicht auswertbar. Entweder waren die Peaks nicht eindeutig oder es konnte kein Allel als Resistenz-assoziiert identifiziert werden. Sieben der 57 Marker binden nur auf dem Allel, das nicht Resistenz-assoziiert ist (0-Allel). Bei 20 Markern weisen der *Rpv8*-Träger und die *Rpv12*-Träger dieselben Allelgrößen auf. Doch in den Markern VVIP05, VMC1E12, sc81_7, GF14-21, sc81_8.2, UDV-350, VMC2H12 und UDV-370 weichen sie voneinander ab. Dabei ist der Marker VMC1E12 etwa 500 kb von Chr14V015 (Gf9918 und PN40024) entfernt. Die Marker UDV-350 und UDV-370 wurden von Venuti *et al.* 2013 als begrenzende Marker beschrieben, für Züchtungsarbeiten empfohlen und sind entsprechend als *Rpv12*-assoziiert zu bewerten.

Im Rahmen dieser Arbeiten wurden auf dem Haplotyp Gf9918 vier neue SSR-Marker entwickelt, wovon einer, Gf14-63 (398 bp) als *Rpv12*-spezifisch zu bewerten ist. Dies konnte an Selbstungslinien einer offenen Abblüte von `Kunbarat´, sowie diverser anderer anfälliger und resistenter Genotypen gezeigt werden. Der Marker Gf14-63 liegt etwa 4,5 kb entfernt von Gen#1 sowie etwa 6,8 kb von Gen#2 entfernt. Auch bei dem *Rpv8*-Träger konnte die Resistenz-assoziierte Fragmentgröße von 398 bp dokumentiert werden. Bei dem ebenfalls neu entwickelten Marker, Gf14-61 (300 bp) konnte bei dem *Rpv8*-Träger allerdings nur ein 277 bp langes Fragment dokumentiert werden.

In Kombination mit den Abweichungen bei den Markern UDV-350 und UDV-370 (jeweils um 2 bp) sowie den Markern sc81_8.2 und VMC2H12 zeichnet sich kein eindeutiges Bild, ob es sich bei den Loci *Rpv8* und *Rpv12* um Loci mit denselben Resistenzeigenschaften handelt. Es wäre möglich, dass sich der *Rpv12*-Locus ähnlich dem *Rpv3*-Locus in unterschiedliche Varianten einteilen lässt (Di Gaspero *et al*., 2012).

Auch Venuti *et al.* (2013) nahmen sich dieser Fragestellung an. Da Blasi *et al.* (2011) für den *Rpv8*-Träger keine Ausbildung von Sporangiophoren dokumentieren konnten, gingen Venuti *et al.* davon aus, dass es sich um einen unabhängigen Locus handeln könnte. In Blattscheibentests mit der *Rpv8*-tragenden Rebe konnte jedoch die Ausbildung von Sporangiophoren beobachtet werden. Allerdings haben die Blätter einer

V. amurensis eine unterschiedliche Struktur als die Rückkreuzungen `Kunbarat´ und `Kunleany´, auch zeigten sich diese Reben empfindlich für wärmere Temperaturen. Dies zeigte sich durch einen Wachstumsstopp im Sommer und einen starken Austrieb im Herbst. Vergleiche der unterschiedlichen Resistenzträger sind daher kritisch zu betrachten.

4.3 Der Genotyp DEU098-2006-017

Im Verlauf der Arbeiten wurden alle Rebsorten, die in der Genbank des Geilweilerhofs unter *Vitis amurensis* geführt werden, mittels Blattscheibentests hinsichtlich der Widerstandsfähigkeit gegenüber *P. viticola* untersucht. Dabei zeigte sich bereits bei der Anzucht im Gewächshaus auf Grund morphologischer und physiologischer Eigenschaften, dass einige dieser Pflanzen nicht zur Art *V. amurensis* gehören können. Während *V. amurensis* zur Sommerzeit nahezu keinen Wuchs zeigte, saure Erde bevorzug und im Wachstum zumeist gedrungen wirkt, zeigte sich der Genotyp DEU098-2006-017 als schnellwachsende und weitgehend anspruchslose Rebe, welche durch warme Temperaturen nicht in ihrem Wachstum beeinflusst wird.

Während *V. amurensis* dicke, keilförmige, blasige Blätter aufweist, die auf der Oberfläche dunkelgrün, auf der Unterseite hellgrün sind und mit ogivalen (spitzbogigen) Zähnen umrandet sind, präsentierten sich Blätter des Genotyps DEU098-2006-017 glatt, mit langen, spitzen Endzähnen, welche charakteristisch für *V. riparia* sind und dominant vererbt werden. Junge Blätter von *V. riparia* sind länger als breit, hellgrün, oben glänzend und glatt, auf der Unterseite jedoch mit kurzen weichen Haaren bewachsen (Galet, 1999).

Ein weiteres, wichtiges Differenzierungsmerkmal ist der Befall durch *Daktulosphaïra vitifoliae*, welcher sich vorwiegend bei *V. rupestris* zeigt und im Freiland beobachtet werden konnte. Bei dem Genotypen DEU098-2006-017 war ein leichter Befall von *Daktulosphaïra vitifoliae* festzustellen. Es entstand so die Annahme, dass es sich bei dem Genotypen DEU098-2006-017 um eine Kreuzung aus *V. rupestris* und *V. riparia* handelt. Dafür sprechen auch die eingehüllten Triebspitzen und die Blattform. Während *V. riparia* sich durch lange Blätter, mit spitzen, langen Zähnen auszeichnet, sind Blätter von *V. rupestris* eher nierenförmig und auch auf der Unterseite ohne nennenswerte Trichom-Ausbildung (persönliches Gespräch mit Dr. Erika Maul, 2020; Galet, 1999).

Im Blattscheibentest zeigte sich DEU098-2006-017 äußerst widerstandsfähig gegenüber *P. viticola*. Dies bestätigte sich in mikroskopischen Studien und der Analyse des Myzelwachstums. Es konnte eine ähnlich starke Unterdrückung des Myzelwachstums nachgewiesen werden wie bei dem *Rpv12*-Träger 2014-099-0003.

Gemäß vorliegender Daten konnte bei diesem Genotyp bisher jedoch kein *Rpv*-Locus identifiziert werden. Zur Abklärung, ob einer der bekannten Resistenzloci für die stark ausgeprägte Resistenz des Genotypen DEU098-2006-017 verantwortlich ist, wurden Markeranalysen des Genotyps im Vergleich zu Genotypen durchgeführt, auf welchen die Resistenzloci ursprünglich identifiziert worden waren. Auf *V. rupestris* wurden bis dato (04/2021) die Loci *Rpv3.1* (*Rpv3*$^{299\text{-}279}$), *Rpv3.2* (*Rpv3*$^{null\text{-}297}$), sowie *Rpv3*$^{null\text{-}297}$, *Rpv3*$^{299\text{-}314}$, *Rpv3*$^{null\text{-}287}$, *Rpv19* und *Rpv28* beschrieben (Di Gaspero *et al.*, 2012; Zyprian *et al.*, 2016; Divilov *et al.,* 2018; Bhattarai *et al.*, 2020; Maul *et al.*, 2021). *V. riparia* wird als mögliche Quelle der Loci *Rpv3.3* (=*Rpv3*$^{null\text{-}271}$), *Rpv3*$^{321\text{-}312}$, *Rpv5, Rpv6, Rpv9* und *Rpv13* angegeben (Di Gaspero *et al*., 2012; Marguerit *et al*., 2009; Moreira *et al*., 2011; Maul *et al.*, 2021). Für die Resistenzloci *Rpv3.1, Rpv3.2* und *Rpv3.3* konnte keine Übereinstimmung mit den Referenzsorten `Merzling´, `Regent´, `Solaris´, `Munson´ und `Noah´ festgestellt werden. Auch weitere Resistenzloci wie *Rpv4, Rpv7*, *Rpv8*, *Rpv10*, *Rpv12* und *Rpv14* konnten ausgeschlossen werden.

Zudem kann das Vorhandensein des Locus *Rpv1* ausgeschlossen, bzw. mit dem Resistenz-assoziierte Marker VVIB32 nicht bestätigt werden, da dieser Marker bei DEU098-2006-017 eine Allelgröße von 150 anzeigt, welche jedoch auch bei *Rpv1*-negativen Rebsorten `Solaris´, `Bayard´ und `Boerner´ auftritt und somit nicht als Resistenz-assoziiert zu bewerten ist. Der Referenzgenotyp 28-8-78 für den Locus *Rpv1*, auf welchem *Rpv1* beschrieben wurde, stand nicht zur Verfügung (Merdinoglu *et al.*, 2003). Stattdessen wurde als Referenzpflanze der Genotyp VRH3082 1-42 mitgeführt, welcher wie VRH3082 1-49 (Elter von 2004-043-0021) eine Rückkreuzung von *Muscadinia rotundifolia* ist und den Locus *Rpv1*/*Run1* (geprüft durch AG Trapp) trägt. Bei den Markern VVIB32 und VMC8G9, die entsprechend der Publikationen für *Rpv1* und *Run1* Resistenz-assoziiert sind, konnten zwischen den beiden Genotypen keine Übereinstimmungen gefunden werden (vgl. Merdinoglu *et al.*, 2003; Barker *et al*., 2005).

Auf Grund der Charakteristika von *V. riparia* rückten vor allem die Loci *Rpv5* und *Rpv6* in den Fokus der Markeranalyse. Entsprechend der Publikation von Marguerit *et al*. (2009) wurden die Marker VVIO52 bzw. VMC8G9 (*Rpv5*/*Rpv6*) auf die *V. riparia* Selektion `Gloire de Montpellier´ angewendet und mit DEU098-2006-017 verglichen. Bei VVIO52 teilen sich die beiden Genotypen zwar ein Allel (384), doch diese Allelgröße

konnte auch bei den Genotypen `Merzling´, `Regent´ und `Solaris´ nachgewiesen werden und ist nicht als Resistenz-assoziiert zu beurteilen. Der *Rpv6*-Locus kann mangels übereinstimmenden Allelgrößen als Locus ausgeschlossen werden. Für weitere Resistenz-assoziierte Loci waren weder detaillierte Markerdaten bekannt noch entsprechende Referenzsorten verfügbar.

Demnach zeigt sich der Genotyp DEU098-2006-017 als vielversprechende neue Ressource für einen züchterisch verwendbaren *P. viticola*-Resistenzlocus.

Abhängig von der Lage des potenziellen Resistenzlocus bieten sich neue Kombinationsmöglichkeiten bei der Züchtung pyramidisierter Genotypen an. Für die 19 Chromosomen der Rebe konnten bisher Resistenzloci gegen *P. viticola* auf 14 verschiedenen Chromosomen identifiziert werden. In kommerziellen Rebsorten haben bis dato vor allem die Loci *Rpv3.1, Rpv3.2, Rpv3.3*, *Rpv10* und *Rpv12* Verwendung gefunden. Zu nennen sind hier beispielweise die Rebsorten `Regent´ und `Johanniter´, jeweils mit *Rpv3.1*, *Ren3* und *Ren9*, die Rebsorte `Sauvignac´ mit den Loci *Ren3*, *Ren9*, *Rpv3.1* und *Rpv12*, die Rebsorte `Solaris´ mit den Loci *Rpv3.3* und *Rpv10* oder die Rebsorte `Calardis blanc´ mit den Loci *Ren3*, *Ren9*, *Rpv3.1* und *Rpv3.2* (Maul *et al*., 2021). *Rpv3* liegt auf Chromosom 18, während *Rpv10* auf *Chr. 9* und *Rpv12* auf Chr. 14 kartieren. Für die Züchtung ist eine Verteilung auf möglichst unterschiedlichen Chromosomen vorteilhaft, da so keine intrachromosomale Rekombination nötig ist, um Loci miteinander zu kombinieren.

4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnten einige Eigenheiten des *Rpv12*-Locus herausgestellt werden.

Zunächst wurde die Abstammung der primär untersuchten Genotypen `Kunbarat´ und `Kunleany´ mittels SSR-Marker-Analyse überprüft. Dabei zeigte sich, dass diese Genotypen Vollgeschwister sind, statt wie bisher angenommen nur einen parentalen Genotypen (28/19) teilen. Auch ihre Nachkommenschaft wurde analysiert. Hier erwies sich, dass die Sorte `Petra´ von `Savagnin blanc´ abstammt und nicht wie bisher angenommen von `Pinot Noir´.

Es konnte gezeigt werden, dass Träger des *Rpv12*-Locus frühzeitig eine hypersensitive Reaktion einleiten. Die Abwehr des Pathogens scheint bei diesen Pflanzen auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, speziell H_2O_2, und der damit einhergehenden Ausbildung von Nekrosen zurückzuführen zu sein. In den resistenten Reben wurde eine

vermehrte Ausprägung von Haustorien beobachtet. Bei der *Rpv12*-vermittelten Resistenz handelt es sich daher um eine post-Penetrations-Resistenz. Dass Zoosporen die Stomata erreichen und dies bei allen Genotypen in ähnlich großer Anzahl tun, konnte eindeutig nachgewiesen werden. Doch besonders bei Genotypen, die im *Rpv12*-Locus homozygot sind, wie Hozy01 und Hozy10, ließ die Zahl nachweisbarer Zoosporen innerhalb der ersten 24 h nach Inokulation drastisch nach.

Mittels DAB und NBT-Färbung konnte die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies aufgezeigt werden, wobei hier ausschließlich H_2O_2 nachzuweisen war. Weiterhin konnte eine Kombination mit der alkalischen Anilin blau-Färbung Erkenntnisse über die Auswirkungen auf das Myzelwachstum unter Präsenz der ROS liefern.

Untersuchungen hinsichtlich möglicher Infektionsblockaden oder Zellwandverstärkungen durch Kallose-, Suberin- und Lignin- An- und Einlagerungen zeigten keine Assoziation zum *Rpv12*-Locus.

Das Myzelwachstum von *Rpv12*-tragenden Genotypen ist statistisch signifikant verringert. Auch hier stachen die Genotypen Hozy01 (*Rpv12* homozygot) und Hozy10 (*Rpv3.1* und *Rpv12* homozygot) heraus. Dabei zeigte sich ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen: Hozy10 scheint noch weniger Myzel zuzulassen als Hozy01. Dies deutet auf den bereits durch Venuti *et al.* (2013) diskutierten additiven Effekt von *Rpv3* zu *Rpv12* hin. Die Rolle der Homozygotie bedarf weiterer Untersuchungen. Beispielsweise sollte eine umfangreiche Selbstungs-Studie durchgeführt werden, oder auch *Rpv12*-Träger miteinander kombiniert und ihre Nachkommenschaft analysiert werden, um eine statistische Absicherung der beobachteten Inhibition des Myzelwachstums durchzuführen. Bei Nutzung unterschiedlicher *Rpv12*-Donoren für die Kreuzung von Genotypen die homozygot im *Rpv12*-Locus sind, könnte einer möglichen Inzuchtdepression vorgebeugt werden bzw. diese als Ursache eines verminderten Myzelwachstums ausgeschlossen werden.

In einer Kooperation mit CSIRO (Australien) wurde ein SNP-Marker mittels CAPS und SNP-spezifischer PCR als möglicherweise Resistenz-assoziiert befunden. Dies bietet der Züchtung neue technische Möglichkeiten und ermöglicht ein Screening von Rebsorten auf *Rpv12* ohne aufwändige Laborausstattung (Thermocycler und Gelelektrophorese).

Auf genetischer Ebene zeigte sich, dass der *Rpv12*-Locus des Haplotyps Gf9918 zwischen den SSR-Markern UDV-350 und UDV-370 im Vergleich zum Referenzgenom PN40024 um etwa 366 kb verkürzt ist. Auch verfügt er nur über ein Drittel der im

Referenzgenom identifizierbaren *NLR*-Gene (vier statt zwölf). Unter der Annahme, dass sich die Resistenzeigenschaften des Locus auf die *NLR*-Gene zurückführen lassen, ließe sich der zuvor etwa 600 kb umfassende Locus somit auf 100 kb eingrenzen. Durch RNA-Sequenzierung eines (uninfizierten) Blattes des Genotyps 2014-099-0003 konnten CDS auf den Kandidatengenen kartiert werden. Damit konnte nachgewiesen werden, dass eine Transkription der identifizierten Gene stattfindet. Allerdings verfügten manche dieser CDS nur über Teile der NLR-Domänen. Die Möglichkeit eines differentiellen Splicings muss daher in Betracht gezogen und durch künftige Validierung der Transkripte z.B. mittels 5‘-RACE, 3‘-RACE (engl. 5‘/3‘ *rapid amplification of cDNA ends)*, CR-RT-PCR (engl. *circularized reverse transcription PCR*), qRT-PCR (engl. *quantitative real time PCR*) oder RNA-Seq nach Inokulation geprüft werden.

Weiterhin sollte die funktionelle Analyse der Kandidaten-Gene erfolgen. Hierfür könnten beispielweise amiRNAs (engl. *artificial micro RNAs*) für einen *Knock-down* der Kandidaten-Gene in dem *Rpv12*-Träger `Kunbarat´ genutzt oder die Gene mittels Klonierung in anfällige Rebsorten transformiert werden. Bei letzterem Ansatz stellt allerdings die Größe der Kandidatengene eine technische Herausforderung dar.

Ergänzend konnte mit dem Genotyp DEU098-2006-017 eine potenzielle neue *Plasmopara viticola* Resistenzquelle erschlossen werden, da keiner der bekannten Resistenzloci hier vertreten zu sein scheint. Dies bietet der Züchtung neue Möglichkeiten der Pyramidisierung von Resistenzeigenschaften. Hierfür sollen in naher Zukunft Kartierungsarbeiten und QTL-Analysen durchgeführt werden.

5 Literatur

Aist, J. R. **1976**. Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annu. Rev. Phytopathol.* 14, 145−163.

Akaberi, S. **2016**. Dissertation. Volatile Messenger of Death - Grapevine Fatty Acid Hydroperoxide Lyase Acts in Cell-Death Related Immunity. Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Fakultät für Chemie und Biowissenschaften.

Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W. & Blackwell, M. **1996**. Introductory Mycology. *John Wiley and Sons*, New York, Ed.4.

Alikadic, A.; Pertot, I.; Eccel, E.; Dolci, D.; Zarbo, C.; Caffarra, A.; De Filippi, R. & Furlanello, C. **2019**. The impact of climate change on grapevine phenology and the influence of altitude: A regional study. *Agric. For. Meterol.* 271, 73-82.

Alleweldt, G. **& Possingham**, J. V. **1988**. Progress in grapevine breeding. *Theor. Appl. Genet.* 75, 669–673.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. & Lipman, D. J. **1990**. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol*. 215, 403–410.

Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lipman, D. J. **1997**. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17), 3389–3402.

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.

Asada, K. **1999**. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639.

Atiakshin, D.; Buchwalow, I. & Tiemann, M. **2020**. Mast cells and collagen fibrillogenesis. *Histochem. Cell Biol.* 154, 21−40.

Auh, C. K. **& Murphy**, T. M. **1995**. Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor stimulated rose cells. *Plant Physiol.* 107, 1241–1247.

Bacic, A., Harris, P. J. & Stone, B. A. **1988**. Structure and function of plant cell walls. In: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 14 (J. Preiss, ed.), Academic Press, New York, 297–371.

Baehner, R. L.; Boxer, L. A. & Davis, J. **1976**. The biochemical basis of Nitroblue Tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. Blood, 48(2), 309-313.

Bailey, L. H. **1934.** Gentes Herbarum – Occasional Papers on the Kinds of Plants Vol.III Ithaca, New York. Fasc. IV The Species of Grapes peculiar to North America.

Baker, C. J. **& Orlandi**, E. W. **1995**. Active Oxygen in Plant Pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol*. 33, 299−321.

Barker, C. L.; Donald, T.; Pauquet, J.; Ratnaparkhe, M. B.; Bouquet, A.; Adam-Blondon, A.-F.; Thomas, M. R. & Dry, I. **2005**. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theor. Appl. Genet.* 111, 370–377.

Beakes, G. W.; Glockling, S. L. & Sekimoto, S. **2012**. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. *Protoplasma* 249, 3–19.

Bengtson, P.; Bastviken, D. & Öberg, G. **2013**. Possible roles of reactive chlorine II: assessing biotic chlorination as a way for organisms to handle oxygen stress. *Environ. Microbiol.* 15, 991–1000.

Berkeley, M. C. **1847**. The Gardeners’ Chronicle. *47,* 779.

Bhattarai, G.; Fennell, A.; Londo, J. P.; Coleman, C. & Kovacs, L. G. **2020**. A Novel Grape Downy Mildew Resistance Locus from *Vitis rupestris*. *Am. J. Enol. Vitic*. 72, 12−20.

Bhuiyan, N. H.; Selvaraj, G.; Wei, Y. & King, J. **2009**. Role of lignification in plant defense. *Plant Signal. Behav.* 4(2), 158−159.

Bigeard, J.; Colcombet, J. & Hirt, H. **2015**. Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Mol. Plant* 8, 521–5.

Blasi, P.; Blanc, S.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Prado, E.; Rühl, E. H.; Mestre, P. & Merdinoglu, D. **2011**. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and

genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theor. Appl. Genet.* 123, 43−53.

Bleyer, G.; Kassemeyer, H.-H.; Krause, R.; Viret, O. & Siegfried, W. **2008**. „VitiMeteo Plasmopara“ – Prognosemodell zur Bekämpfung von *Plasmopara viticola* (Rebenperonospora) im Weinbau. *Gesunde Pflanzen* 60, 91–100.

Boerjan, W.; Ralph, J. & Baucher, M. **2003**. Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 519–46.

Bolwell, G. P. **& Wojtaszek**, P. **1997**. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Path*. 51(6), 347−366.

Bournonville, C. F. G. **& Díaz-Ricci**, J. C. **2011**. Quantitative Determination of Superoxide in Plant Leaves Using a Modified NBT Staining Method. Phytochem. Anal. 22, 268-271.

Bowler, C.; Van Montagu, M. & Inzé, D. **1992**. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83−116.

Bradley, D. J.; Kjellbom, P. & Lamb, C. J. **1992**. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* 70(1), 21−30.

Brilli, M.; Asquini, E.; Moser, M.; Bianchedi, P. L.; Perazzolli, M. & Si-Ammour, A. **2018**. A multi-omics study of the grapevine-downy mildew (*Plasmopara viticola*) pathosystem unveils a complex protein codingand noncoding-based arms race during infection. *Sci. Rep.* 8(757).

Brodersen, P. **& Voinnet**, O. **2006**. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* 22, 268−280.

Burruano, S. **2000**. The life-cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine. *Mycologist* 4(4).

Busam, G.; Kassemeyer, H.-H. & Matern, U. **1997**. Differential expression of chitinases of *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiol.* 115, 1029−1038.

Cadoret, A. **1923**. Bouillies bleues et vignes bleues. 7e année d’experiences. *Le Progrès Agricole et Viticole* 40, 380–382.

Cadoret, A. **1931**. Les léçons du mildiou en 1930. *Le Progrès Agricole et Viticole* 95, 187–188.

Cahill, D. M. **& Hardham**, A. R. **1994**. Exploitation of zoospore taxis in the development of a novel dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*. 84(2), 193−200.

Caillaud, M.-C.; Piquerez, S. J. & Jones, J. D. **2012**. Characterization of the membrane associated HaRxL17 Hpa effector candidate. *Plant Signal. Behav.* 7, 145–149.

Caillaud, M.-C.; Wirthmueller, L.; Sklenar, J.; Findlay, K.; Piquerez, S. J. M.; Jones, A. M. E.; Robatzek, S. Jones, J. D. G. & Faulkner, C. **2014**. The plasmodesmal protein PDLP1 localises to haustoria-associated membranes during downy mildew infection and regulates callose deposition. *PLoS Pathogens* 10(11).

Canaguier, A**.**; Grimplet, J.; Scalabrin, S.; Di Gaspero, G.; Mohellibi, N.; Choisne, N.; Rombauts, S.; Ruztenholtz, C.; Morgante, M.; Quesneville, H. & Adam-Blondon, A.-F. **2017**. A new version of the grapevine reference genome assembly (12X.v2) and of its annotation (VCost.v3). *Genom. Data* 14, 56−62.

Cantu Lab. **2021**. Grape Genomics. http://www.grapegenomics.com/

Carisse, O. **2016**. Development of grape downy mildew (*Plasmopara viticola*) under northern viticulture conditions: influence of fall disease incidence. *Eur. J. Plant Pathol.* 144:773–783.

Chisholm, S. T.; Coaker, G.; Day, B. & Staskawicz, B. J. **2006**. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124(4), 803–814.

Chitarrini, G.; Riccadonna, S.; Zulini, L.; Vecchione, A.; Stefanini, M.; Larger, S.; Pindo, M.; Cestaro, A.; Franceschi, P.; Magris, G.; Foria, S.; Morgante, M.; Di Gaspero, G. & Vrhovsek, U. **2020**. Two-omics data revealed commonalities and differences between *Rpv12*- and *Rpv3*-mediated resistance in grapevine. *Sci. Rep*. 10, 12193.

Commission Regulation. (EC) No **473/2002** of 15 March 2002 amending Annexes I, II and VI to Council Regulation (EEC) No 2092/91 on organic production of agricultural products and indications referring thereto on agricultural products and foodstuffs, and laying down detailed rules as regards the transmission of information on the use of copper compounds. OJ L 75, 16.3.2002, 21-24.

Corio-Costet, M.-F.; Dufour, M.-C.; Cigna, J.; Abadie, P. & Chen, W.-J. **2010**. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *Europ. J. Plant Pathol.* 129, 315–329.

Costet, L.; Dorey, S.; Fritig, B. & Kauffmann, S. **2002**. A pharmacological approach to test the diffusible signal activity of reactive oxygen intermediates in elicitor-treated tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* 43(1), 91−98.

Cui, H.; Tsuda, K. & Parker, J. E. **2015**. Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 487−511.

Dai, G. H.; Andary, C.; Mondolot-Cosson, L. & Boubals, D. **1995**. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. *Physiol. Mol. Plant Path.* 46, 177−188.

Dangl, J. L. **& Jones**, J. D. G. **2001**. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826−832.

Daudi, A. **& O'Brien**, J. A. **2012**. Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves*. Bio Protoc.* 2 (18).

Delas, J. **2002**. The Bordeaux mixture. COST Action 837. 4th WG2 Workshop, Bordeaux 2002 – Risk assessment and sustainable land management using plants in trace element-contaminated soils. 80-82.

DeLille, J. M.; Sehnke, P. C. & Ferl, R. J. **2001**. The *Arabidopsis* 14-3-3 Family of Signaling Regulators. *Plant Physiol*. 126, 35–38.

Dercks, W. **& Creasy**, L. L. **1989**. The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant Path.* 34, 189−202.

Dermen, H. **1964**. Cytogenetics in hybridization of bunch and muscadine-type grapes. *Econ Bot* 18, 137–148.

DeStatis. **2016**. Land- und Forstwirtschaft, Fischerei. Grunderhebung der Rebflächen. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.

Díez-Navajas, A. M.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Greif, C. & Merdinoglu, D. **2008**. Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, Studied at the Tissue Level. *Phytopath.* 98(7), 776-780.

Di Gaspero, G. **& Cipriani**, G. **2003**. Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. *Mol Gen Genomic* 269, 612−623.

Di Gaspero, G.; Copetto, D.; Coleman, C.; Castellarin, S. D.; Eibach, R.; Kozma, P.; Lacombe, T.; Gambetta, G.; Zvyagin, A.; Cindrić, P.; Kovács, L.; Morgante, M. & Testolin, R. **2012**. Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *Theor. Appl. Genet.* 124, 277–286.

Dinesh-Kumar, S. P.; Tham, W.-H. & Baker, B. J. **2000**. Structure–function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. *PNAS* 97(26), 14789−14794.

Divilov, K.; Barba, P.; Cadle, L. & Bruce, D. **2018**. Single and multiple phenotype QTL analyses of downy mildew resistance in interspecific grapevines. *Theor. Appl. Genet.* 131, 1133–1143.

Dixon, M. S.; Jones, D. A.; Keddie, J. S.; Thomas, C. M.; Harrison, K. & Jones, J. D. G. **1996**. The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* 84, 451–459.

Dixon, R. A. **2001**. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843–847.

Doke, N. **1983**. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* 23, 345–357.

Doligez, A.; Adam-Blondon, A. F.; Cipriani, G.; Di Gaspero, G.; Laucou, V.; Merdinoglu, D.; Meredith, C. P.; Riaz, S.; Roux, C. & This, P. **2006**. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping Populations. *Theor. Appl. Genet.* 113(3), 369-382.

Dong, X.; Hong, Z.; Chatterjee, J.; Kim, S. & Verma, D. P. **2008**. Expression of callose synthase genes and its connection with *Npr1* signaling pathway during pathogen infection. *Planta* 229, 87–98.

Dougherty, M. K. **& Morrison**, D. K. **2004**. Unlocking the code of 14-3-3. *J. Cell Sci*.117, 1875−1884.

Dry, I.; Smith, H. & Thomas, M. **2017**. Identification and marker-assisted selection of genes for reducing the susceptibility of new winegrape cultivars to fungal pathogens. CSIRO Agriculture & Food.

Dubrow, Z.; Sunitha, S.; Kim, J.-G.; Aakre, C. D.; Girija, A. M.; Sobol, G.; Teper, D.; Chen, Y. C.; Ozbaki-Yagan, N.; Vance, H.; Sessa, G. & Mudgett, M. B. **2018**. Tomato 14-3-3 proteins are required for *Xv3* disease resistance and interact with a subset of *Xanthomonas euvesicatoria* effectors. *MPMI* 31(12), 1301−1311.

Eibach, R.; Zyprian, E.; Welter, L. & Töpfer, R. **2007**. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* 46(2), 120–124.

Eddy, S. R. **2011**. Accelerated profile HMMsearches. *PLOS Comp. Biol.* 7, e1002195.

Eisenmann, B.; Czemmel, S.; Ziegler, T.; Buchholz, G.; Kortekamp, A.; Trapp, O.; Rausch, T.; Dry, I. & Bogs, J. **2019**. *Rpv3–1* mediated resistance to grapevine downy mildew is associated with specific host transcriptional responses and the accumulation of stilbenes. *BMC Plant Biol.* 19(343).

Eisenmann, B. **2019**. Dissertation. Grapevine defense responses in *Rpv3*- and *Rpv12*-dependent resistance against *Plasmopara viticola* and their implication for crop protection management. Fakultät für Naturwissenschaften, Mathematik und Informatik, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

Eschrich, W. **& Currier**, H. B. **1964**. Identification of Callose by its Diachrome and Fluorochrome Reactions. *Stain Technol*. 39(5).

Eulgem, T.; Rushton, P.J.; Schmelzer, E.; Hahlbrock, K. & Somssich, I. E. **1999**. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* 18, 4689–4699.

Eurostat. **2007**. The use of plant protection products in the European Union. http://epp.eurostat.ec.europa.eu.

Faoro, F. **& Iriti**, M. **2009**. Plant cell death and cellular alterations induced by ozone: key studies in mediterranean conditions. *Environ. Poll.* 157, 1470–1477.

Fatahi, R.; Ebadi, A.; Bassil, N.; Mehlenbacher, S. A. & Zamani, Z. **2003**. Characterization of Iranian grapevine cultivars using microsatellite markers. *Vitis* 42(4), 185–192.

Fawke, S.; Doumane, M. & Schornack, S. **2015**. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *MMBR* 79(3), 263–280.

Feechan, A.; Anderson, C.; Torregrosa, L.; Jermakow, A.; Mestre, P.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Merdinoglu, D.; Walker, A. R.; Cadle-Davidson, L.; Reisch, B.; Aubourg,

S.; Bentahar, N.; Shrestha, B.; Bouquet, A.; Adam-Blondon, A.-F.; Thomas, M. R. & Dry, I. B. **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.

Fei, Q.; Zhang, Y.; Xia, R. & Meyers, B. C. **2016**. Small RNAs add zing to the zig-zag-zog model of plant defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29(3), 165−169.

Fellbrich, G.; Romanski, A.; Varet, A.; Blume, B.; Brunner, F.; Engelhardt, S.; Felix, G.; Kemmerling, B.; Krzymowska, M. & Nürnberger, T. **2002**. NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant J.* 32, 375–390.

Ferreira, R. B.; Monteiro, S.; Freitas, R.; Santos, C. N.; Chen, Z.; Batista, L. M.; Duarte, J.; Borges, A. & Teixeira, A. R. **2006**. Fungal pathogens: the battle for plant infection. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25(6), 505–524.

Fiore-Donno, A. M. **& Bonkowski**, M. **2021**. Different community compositions between obligate and facultative oomycete plant parasites in a landscape-scale metabarcoding survey. *Biol. Fertil. Soils* 57, 245–256.

Flors, V., Ton, J.; Jakab, G. & Mauch-Mani, B. **2005**. Abscisic acid and callose: team players in defence against pathogens? *J. Phytopathol*. 153, 377−383.

Foria, S.; Magris, G.; Morgante, M. & Di Gaspero, G. **2017**. The genetic background modulates the intensity of *Rpv3*-dependent downy mildew resistance in grapevine. *Plant Breed.* 137, 220–228.

Fröbel, S. **& Zyprian**, E. **2019**. Colonization of different grapevine tissues by *Plasmopara viticola* - a histological study. *Front. Plant. Sci.* 10(951).

Fröbel, S. **2019**. Dissertation. Studien zum Resistenzlokus *Rpv10* gegen den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) der Weinrebe (*Vitis vinifera*). Karlsruher Institut für Technologie. Fakultät für Chemie und Biowissenschaften.

Galet, P. **1999**. Cépages et Vignobles de France. Tome 1 Les vignes américaines.

Gassmann, W. **2008**. Alternative splicing in plant defense. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 326, 219–233.

Gessler, C.; Pertot, I. & Perazzolli, M. **2011**. Review. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 3−44.

Gindro, K.; Pezet, R. & Viret, O. **2003**. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiol. Bioch.* 41(9), 846−853.

Glazebrook, J. **2005**. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205–27.

Gobbin, D.; Rumbou, A.; Linde, C. C & Gessler, C. **2006**. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards. *Mol. Plant Pathol.* 7(6), 519–531.

Goidanich, G.; **1983**. Manuale di Patologia Vegetale, vol II. Edizioni Agricole Bologna.

Gómez-Gómez, G. **& Boller**, T. **2000**. FLS2: an LRR Receptor–like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5, 1003-1011.

Govrin, E. M. **& Levine**, A. **2000**. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinere*a. *Curr. Biol.* 10(13), 751–757.

Graça, J. **& Pereira**, H. **1997**. Cork suberin: a glyceryl based polyester. *Holzforschung* 51, 225–234.

Graça, J. **& Santos**, S. **2007**. Suberin: a biopolyester of plants' skin. *Macromol. Biosci.* 7(2), 128–135.

Hamdan, A.J. S. **& Basheer-Salimia**, R. **2010**. Preliminary Compatibility between Some Table-Grapevine Scion and Phylloxera-Resistant Rootstock Cultivars. *Jordan J. Agric. Sci.* 6(1).

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 practical approach*. Herausgeber: Glover, D. M. Oxford, 109–135.

Handley, R.; Ekbom, B. & Ågren, J. **2005**. Variation in trichome density and resistance against a specialist insect herbivore in natural populations of *Arabidopsis thaliana. Ecol. Entomol. 30, 284–292.*

Hayat, M. A. **1993**. Stains and cytochemical methods. Plenum Press, New York.

Heath, M. C. **2000**. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 315–319.

Hedrick, U. P. **1908**. The grapes of New York. J. B. Lyon State Printers, Albany.

Hood, M. E. **& Shew**, H. D. **1996**. Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant fungal interactions. *Phytopathology* 86(7), 704–708.

Hulbert, S. H.; Webb, C.A.; Smith, S. M. & Sun, Q. **2001**. Resistance gene complexes: evolution and utilization*. Annu. Rev. Phytopathol*. 39, 285-312.

Irieda, H.; Inoue, Y.; Mori, M.; Yamada, K.; Oshikawa, Y.; Saitoh, H.; Uemura, A.; Terauchi, R.; Kitakura, S.; Kosaka, A.; Singkaravanit-Ogawa, S. & Takano, Y. **2019**. Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases. Proceedings of the National Academy of Sciences 116(2), 496-505.

Jackson, R. S. **2008**. Wine Science, Principles and Applications. Academic Press, USA. 3rd Edition

Jaillon, O.; Aury, J.-M.; Noel, B.; Policriti, A.; Clepet, C.; Casagrande, A.; Choisne, N.; Aubourg, S.; Vitulo, N.; Jubin, C.; Vezzi, A.; Legeai, F.; Hugueney, P.; Dasilva, C.; Horner, D.; Mica, E.; Jublot, D.; Poulain, J.; Bruyère, C.; Billault, A.; Segurens, B.; Gouyvenoux, M.; Ugarte, E.; Cattonaro, F.; Anthouard, V.; Vico, V.; Del Fabbro, C.; Alaux, M.; Di Gaspero, G.; Dumas, V.; Felice, N.; Paillard, S.; Juman, I.; Moroldo, M.; Scalabrin, S.; Canaguier, A.; Le Clainche, I.; Malacrida, G.; Durand, E.; Pesole, G.; Laucou, V.; Chatelet, P.; Merdinoglu, D.; Delledonne, M.; Pezzotti, M.; Lecharny, A.; Scarpelli, C.; Artiguenave, F.; Pè, M. E.; Valle, G.; Morgante, M.; Caboche, M.; Adam-Blondon, A.-F.; Weissenbach, J.; Quétier, F.; & Wincker P. **2007**. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449, 463–467.

Jannink, J.-L. **& Jansen**, R. **2001**. Mapping epistatic quantitative trait loci with one-dimensional genome searches. *Genetics* 157: 445–454.

Jermini, M.; Blaise, P. & Gessler, C. **2010**. Quantitative effect of leaf damage caused by downy mildew (*Plasmopara viticola*) on growth and yield quality of grapevine 'Merlot' (*Vitis vinifera*). *Vitis* 49(2), 77–85.

Jones, D. A., Dickinson, M.J., Balint-Kurti, P.J., Dixon, M. S. & Jones, J. D. G. **1993**. Two complex resistance loci revealed in tomato by classical and RFLP mapping of the

Cf-2, *Cf-4*, *Cf-5*, and *Cf-9* genes for resistance to *Cladosporium fulvum. Mol. Plant-Microbe Interact.* 6, 348–357.

Jones, J. D. G. **& Dangl**, J. L. **2006**. The plant immune system. *Nature*. 444, 323-329.

Jones, D. A **& Takemoto**, D. **2004**. Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 16(1), 48-62.

Judelson, H. S. **& Ah-Fong**, A. M. V. **2019**. Exchanges at the plant-oomycete interface that influence disease. *Plant Physiol.* 179, 1198–1211.

Junka, A.; Bartoszewicz, M.; Smutnicka, D.; Secewicz, A & Szymczyk, P. **2014**. Efficacy of antiseptics containing povidone-iodine, octenidine dihydrochloride and ethacridine lactate against biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* measured with the novel biofilm-oriented antiseptics test. *Int. wound J.* 11(6), 730-734.

Jürges, G.; Kassemeyer, H.-H.; Dürrenberger, M.; Düggelin, M. & Nick, P. **2009**. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biol.* 11, 886–898.

Kalinowski, S., Wagner, A. & Taper, M. **2006**. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Mol. Ecol. Notes* 6, 576–579.

Kamoun, S. **2001**. Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 295–300.

Karow, J. **2011**. PacBio Ships First Two Commercial Systems; Order Backlog Grows to 44. GenomeWeb. https://www.genomeweb.com/sequencing/pacbio-ships-first-two-commercial-systems-order-backlog-grows-44.

Katiyar-Agarwal, S. **& Jin**, H. **2010**. Role of small RNAs in host-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol*. 48, 225–246.

Kennelly, M. M.; Gadoury, D. M.; Wilcox, W. F.; Magarey, P. & Seem, R. C. **2005**. Seasonal development of ontogenic resistance to downy mildew in grape berries and rachises. *Phytopathology* 95(12), 1445–1452.

Kennelly, M. M. Gadoury, D. M.; Wilcox, W. F.; Magarey, P. & Seem, R. C. **2007**. Primary infection, lesion productivity, and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* 97(4).

Kiefer, B.; Riemann, M.; Buche, C.; Kassemeyer, H. H. & Nick, P. **2002**. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta*, 215(3), 387–393.

Koleda, I. **1975**. Results of crossing *Vitis amurensis* and *Vitis vinifera* in breeding frost resistant Grapes. *Vitis* 14, 1–5.

Komárek, M.; Száková, J.; Rohošková, M.; Javorská, H.; Chrastný, V. & Balík, J. **2008**. Copper contamination of vineyard soils from small wine producers: a case study from Czech Republic. *Geoderma* 147, 16–22.

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.

Koren, S., Rhie, A., Walenz, B. P., Dilthey, A. T., Bickhart, D. M., Kingan, S. B., Hiendleder, S., Williams, J. L., Smith, T. P. L. & Phillippy, A. M. **2018**. *De novo* assembly of haplotype-resolved genomes with trio binning. *Nat. Biotechnol.* 36, 1174-1182.

Kortekamp, A.; Wind, R. & Zyprian, E. **1997**. The role of callose deposits during infection of two downy mildew-tolerant and two-susceptible *Vitis* cultivars. *Vitis* 36(2), 103–104.

Kortekamp, A.; Wind, R. & Zyprian, E. **1998**. Investigation of the interaction of *Plasmopara viticola* with susceptible and resistant grapevine cultivars. *J. Plant. Dis. Protect.* 105(5), 475–488.

Kortekamp, A. **& Zyprian**, E. **1999**. Leaf hairs as a basic protective barrier against downy mildew of grape. *J. Phytopathol*. 147(7-8), 453–459.

Kortekamp, A. **2005**. Staining methods for the investigation of *Plasmopara viticola* and its infection structures in semi-thin sections. *Vitis* 44(1), 45–47.

Kortekamp, A.; Welter, L.; Vogt, S.; Knoll, A.; Schwander, F.; Töpfer, R. & Zyprian, E. **2008**. Identification, isolation and characterization of a *CC-NBS-LRR* candidate disease resistance gene family in grapevine. *Mol Breed.* 22, 421–432.

Kumar, D.; Yusuf, M. A.; Singh, P.; Sardar, P. & Sarin, N. B. **2014**. Histochemical detection of superoxide and H_2O_2 accumulation in *Brassica juncea* seedlings. *bio-protocol*, 4(8).

Kumar, P.; Chandra, S.; Singh, B.; Chauhan, V. S. & Srivastava, S. **2017**. PCR based RGAs strategy for identification of putative disease resistance genes analogues in sugarcane. *Trends in Biosciences* 10(33), Print: ISSN 0974-8431, 7029-7034.

Laloi, C.; Stachowiak, M.; Pers-Kamczyc, E.; Warzych, E.; Murgia, I. & Apel, K. **2007**. Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 672–677.

Lamb, C. **& Dixon**, R. A. **1997**. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant biol.* 48(1), 251–275.

La Torre, A.; Iovino, V. & Caradonia, F. **2018**. Copper in plant protection: current situation and prospects. *Phytopathol. Mediterr.* 57(2), 201−236.

Laurie, C.; Wang, S.; Carlini-Garcia, L. A. & Zeng, Z.-B. **2014**. Mapping epistatic quantitative trait loci. *BMC Genetics* 15, 112.

Lee, Y. K.; Hippe-Sanwald, S.; Jung, H. W.; Hong, J. K.; Hause, B. & Hwang, B. K. **2000**. *In situ* localization of chitinase mRNA and protein in compatible and incompatible interactions of pepper stems with *Phytophthora capsici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57, 111–121.

Lehmann, S.; Serrano, M.; L'Haridon, F.; Tjamos, S. E. & Metraux, J.-P. **2015**. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochem.* 112, 54–62.

Levine, A.; Tenhaken, R.; Dixon, R. & Lamb, C. J. **1994**. H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583–593.

Li, G., Meng, X., Wang, R., Mao, G., Han, L., Liu, Y. & Zhang, S. **2012**. Dual-level regulation of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in Arabidopsis. *PLOS Genet.* 8(6).

Liu, J.; Liu, X.; Dai, L. & Wang, G. **2007**. Recent progress in elucidating the structure function and evolution of disease resistance genes in plants. *J. Genet. Genomics*. 34, 765-776.

Lodhi, M. A. **& Reisch**, B. I. **1995**. Nuclear DNA content of *Vitis* species, cultivars, and other genera of the *Vitaceae*. *Theor. Appl. Genet.* 90(1), 11–16.

Loskutov, I. G. **1999**. Vavilov and his institute. A history of the world collection of plant genetic resources in Russia. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Lukasik, E., **& Takken** F. L. W. **2009**. STANDing strong resistance proteins instigators of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol*. 12, 427–436.

Luna, E.; Pastor, V.; Robert, J.; Flors, V.; Mauch-Mani, B. & Ton, J. **2011**. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 24(2), 183–193.

Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., Zhang, S. **2011**. Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23(4), 1639–1653.

Marguerit, E.; Boury, C.; Manicki, A.; Donnart, M.; Butterlin, G.; Nemorin, A.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Merdinoglu, D.; Ollat, N. & Decroocq, S. **2009**. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 118(7), 1261–1278.

Marinval, P. **1997**. Vigne sauvage et vigne cultivée dans le Bassin méditerranéen: Émergence de la viticulture, contribution archéobotanique. *L'histoire du vin, une histoire de rites,* 137-172, Paris: Office International de la Vigne et du Vin.

Martin, G. B., Bogdanove, A. J. & Sessa, G. **2003**. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 54, 23-61.

Martins, W. S.; Lucas D. C. S.; Neves, K. F. S. & Bertioli, D. J. **2009**. WebSat - a web software for microsatellite marker development. *Bioinformation* 3(6), 282–283.

Maul, E. ***et al.*** **2021**. *Vitis* International Variety Catalogue – http://www.vivc.de/ (01.2021).

McDonald, B. A. **& Linde**, C. **2002**. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40(1), 349–379.

McGovern, P. E.; Glusker, D. L.; Exner, L. J. & Voigt, M. M. **1996**. Neolithic resinated wine. *Nature* 381, 480–481.

McGovern, P. E. **2003**. Ancient Wine: The Search for the origins of viniculture. *Princeton Univ Press, Princeton.* 363 ff. ISBN 0-691-07080-6.

Mélida, H.; Sandoval-Sierra, J. V.; Diéguez-Uribeondo, J. & Bulone, V. **2013**. Analyses of extracellular carbohydrates in oomycetes unveil the existence of three different cell wall types. *Eukaryot. Cell* 12(2), 194–203.

Melton, R. E.; Flegg, L. M.; Brown, J. K. M.; Oliver, R. P.; Daniels, M. J. & Osbourn, A. E. **1998**. Heterologous expression of *Septoria lycopersicitoma*-tinase in *Cladosporium fulvum*: effects on compatible and incompatible interactions with tomato seedlings. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 11(3), 228–236.

Merdinoglu, D.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Coste, P.; Dumas, V.; Haetty, S.; Butterlin, G. & Greif, C. **2003**. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia. Acta Hort*. 603, 451–456.

Merdinoglu, D.; Butterlin, G.; Bevilacqua, l.; Chiquet, V.; Adam-Blondon, A. F. & Decroocq, S. **2005**. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine *(Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Mol. Breed.* 15(4), 349–366.

Merz, P. R.; Moser, T.; Höll, J.; Kortekamp, A.; Buchholz, G.; Zyprian, E. & Bogs, J. **2015**. The transcription factor VvWRKY33 is involved in the regulation of grapevine (*Vitis vinifera*) defense against the oomycete pathogen *Plasmopara viticola*. *Physiol. Plant.* 153(3), 365–380.

Meyers, B. C.; Dickerman, A. W.; Michelmore, R. W.; Sivaramakrishnan, S.; Sobral, B.W. & Young, N.D. **1999**. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* 20(3), 317–332.

Millardet, P. M. A. **1885a**. The discovery of bordeaux mixture. *Phytopathological classics*, 3. *Am. Phytopath. Sci.* Übersetzt durch Schneiderhan, F. J. von *Traitement du Mildiou par le Mélange de Sulphate de Cuivre et de Chaux. D'Agr. Pratique*, 2, 707-710.

Millardet, P. M. A. **1885b**. Sur l'histoire du traitement du mildiou par le sulphate des cuivre. *Journal d'Agriculture Pratique* 2, 801-805.

Mittler, R.; Herr, E. H.; Orvar, B. L.; van Camp, W.; Willekens, H.; Inze, D. & Ellis, B. E. **1999**. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 96(24), 14165–14170.

Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M. & Van Breusegem, F. **2004**. The reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9(10), 490–498.

Monaghan, J. **& Zipfel**, C. **2012**. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 349–357.

Moore, B. W. **& Perez**, V. J. **1967**. Specific acidic proteins of the nervous system. In FD Carlson, ed, *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*. Prentice-Hall, Inc, The Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, 343–359.

Moreira, F. M.; Madini, A.; Marino, R.; Zulini, L.; Stefanini, M.; Velasco, R.; Kozma, P. & Grando, M. S. **2011**. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Genet. & Genomes* 7, 153–167.

Morris, B. M.; Reid, B. & Gow, N. A. R. **1992**. Electrotaxis of zoospores of Phytophthora palmivora at physiologically relevant field strengths. *Plant Cell Environ.* 15, 645–653.

Morris, B. M. **& Gow**, N. A. R. **1993**. Mechanism of electrotaxis of zoospores of phytopathogenic fungi. *Phytopathology* 83(8), 877–882.

Morrisey, J. P. **& Osbourn**, A. E. **1999**. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol. Biol. Rev*., 63, 708–724.

Mulisch, M. **& Welsch**, U. **2015**. Romeis – Mikroskopische Technik. *Springer Spektrum Berlin Heidelberg*, 19. Auflage, 375–378.

Müller, K. **1938**. Entwicklung der Reben-Peronosporabekämpfung in Baden. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 12, 195–205.*

Müller, M. **2014**. Masterarbeit. Untersuchungen zum frühen Infektionsvorgang des Erregers des Falschen Mehltaus (*Plasmopara viticola*) an unterschiedlich resistenten Reben (*Vitis spec.*). Uni Hohenheim, Institut für Pflanzenzüchtung und Populationsgenetik Fg. Pflanzenzüchtung und Biotechnologie.

Mullins, M. G.; Bouquet A. & Williams L. E. **1992**. Biology of Horticultural Crops: Biology of the grapevine. Cambridge University Press,Cambridge, England , New York, USA, 229-239.

Müllner, S. **2019**. Resistenzforschung - Was ist das eigentlich? Rebe und Wein 10/2019, 33–35.

Müllner, S.; Röckel, F.; Maul, E. & Zyprian, E. **2020**. 'Kunbarat' and 'Kunleany' – full not half-siblings. *Vitis* 59(2).

Myles, S.;Boyko, A. R.; Owens, C. L.; Brown, P. J.; Grassi, F.; Aradhya, M. K.; Prins, B.; Reynolds, A.; Chia, J. M. & Ware, D. **2011**. Genetic structure and domestication history of the grape. *PNAS* 108(9), 3530–3535.

Nars, A.; Lafitte, C.; Chabaud, M.; Drouillard, S.; Mélida, H.; Danoun, S.; Le Costaouëc, T.; Rey, T.; Benedetti, J.; Bulone, V.; Barker, D. G.; Bono, J.-J.; Dumas, B.; Jacquet, C.; Heux, L.; Fliegmann, J. & Bottin, A. **2013**. *Aphanomyces euteiches* cell wall fractions containing novel glucan-chitosaccharides induce defense genes and nuclear calcium oscillations in the plant host *Medicago truncatula*. *PLOS ONE* 8(9), e75039.

Narusaka, M.; Shirasu, K.; Noutoshi, Y.; Kubo, Y.; Shiraishi, T.; Iwabuchi, M. & Narusaka, Y. **2009**. *RRS1* and *RPS4* provide a dual resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *Plant J.* 60, 218–226.

Navarro, L.; Dunoyer, P.; Jay, F.; Arnold, B.; Dharmasiri, N.; Estelle, M.; Voinnet, O. & Jones, J. D. **2006**. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312, 436-439.

Nooren, I. M.; Kaptein, R.; Sauer, R. T. & Boelens, R. **1999**. The tetramerization domain of the Mnt repressor consists of two right-handed coiled coils. *Nat. Struct. Biol*. 6,755-759.

Nürnberger, T.; Brunner, F.; Kemmerling, B. & Piater, L. **2004**. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences*. Immunol. Rev.* 198, 249–266.

Nürnberger, T. **& Lipka**, V. **2005**. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol.* 6(3), 335–345.

O'Brien, J. A.; Daudi, A.; Butt, V. S. & Bolwell, G. P. **2012**. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236, 765–779.

Ordish, G. **1972**. The great wine blight. *Sidgewick & Jackson*, London JM Dent & Sons.

Osbourn, A. E.; Clarke, B. R.; Lunness, P.; Scott, P. R. & Daniels, M. J. **1994**. An oat species lacking avenacin is susceptible to infection by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45(6), 457–467.

Osbourn, A. E. **1996**. Preformed Antimicrobial Compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8, 1821–1831.

Padmanabhan, C., Zhang, X. & Jin, H. **2009**. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12(4), 465-472.

Pagni, M.; Ioannidis, V.; Cerutti, L.; Zahn-Zabal, M.; Jongeneel, C. V.; Hau, J.; Martin, O.; Kuznetsov, D. & Falquet, L. **2007**. MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Res*. 35 (Web Server issue):W433-7. https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/hmmer3_search

Palma-Guerrero, J.; Ma, X.; Torriani, S. F. F.; Zala, M.; Francisco, C. S.; Hartmann, F. E.; Croll, D. & McDonald, B. A. **2017**. Comparative transcriptome analyses in *Zymoseptoria tritici* reveal significant differences in gene expression among strains during plant infection. *MPMI* 30(3), 231–244.

Pan, Q.; Wendel, J. & Fluhr, R. **2000**. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J. Mol. Evol.* 50, 203-213.

Parniske, M., Hammond-Kosack, K. E., Golstein, C., Thomas, C. M., Jones, D. A., Harrison, K., Wulff, B. B. H. & Jones, J. D. G. **1997**. Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the *Cf-4/9* locus of tomato. *Cell* 91, 821–832.

Patil, S. G. **& Patil**, V. P. **1992**. Karyomorphology of *Vitis vinifera*, *V. rotundifolia* and their hybrid. *Cytologia* 57, 91-95.

Pedneault, K. **& Provost**, C. **2016**. Fungus resistant grape varieties as a suitable alternative for organic wine production: Benefits, limits, and challenges. *Sci. Hort.* 208, 57-77.

Pennington, T.; Reiff J. M.; Theiss, K.; Entling, M. H. & Hoffmann, C. **2018**. Reduced fungicide applications improve insect pest control in grapevine. *BioControl* 63, 687-695.

Peressotti, E.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Delmotte, F.; Bellin, D.; Di Gaspero, G.; Testolin, R.;Merdinoglu, D. & Mestre, P. **2010**. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biol.* 10(147), 1–11.

Pesquet, E.; Ranocha, P.; Legay, S.; Digonnet, C.; Barbier, O.; Pichon, M. & Goffner, D. **2005**. Novel markers of xylogenesis in zinnia are differentially regulated by auxin and cytokinin. Plant Physiol. 139, 1821–1839.

Phukan, U. J.; Jeena, G. S. & Shukla, R. K. **2016**. WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants. *Front. Plant Sci.* 7(760).

Pinney, T. **1989**. A history of wine in America: from the beginnings to prohibition. University of California Press, Berkeley.

Powell, K. S. **2008**. Grape Phylloxera: an overview. In: *Root Feeders: An Ecosystem Perspective*. Herausgegeben von Johnson, S. N. und Murray, P. J. *CABI*, UK, Cromwell Press, Trowbridge, Seite 96 ff.

Protsenko, A. **1946**. Novy vozbuditel' mildiu na Amurskom vinograde. *Vinodelie i Vinogradarstvo SSSR* 7, 30–32.

Qi, D.; DeYoung, B. J. & Innes, R. W. **2012**. Structure-function analysis of the coiled-coil and leucine-rich repeat domains of the *RPS5* disease resistance protein. *Plant Physiol.* 158, 1819–1832.

R Core Team. **2020**. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/.

Richter, R.; Rossmann, S.; Gabriel, D.; Töpfer, R.; Theres, K. & Zyprian, E. **2020**. Differential expression of transcription factor- and further growth-related genes correlates with contrasting cluster architecture in *Vitis vinifera* `Pinot Noir´ and *Vitis* spp. genotypes. *Theo.Appl. Gen.* 133, 3249–3272.

Ristaino, J. B. **2002**. Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. *Microbes Infect*. 4(13), 1369–1377.

Rousseau, J.; Chanfreau, S. & Bontemps, É. **2013**. Les Cépages résistants aux maladies cryptogamiques: panorama européen: guide technique. *Groupe ICV, Bordeaux*, 228.

Salmon, S. **& Hudson**, S. M. **1997**. Crystal Morphology, Biosynthesis, and Physical Assembly of Cellulose, Chitin, and Chitosan. *J. Macromol. Sci. Part C: Polymer Reviews*, 37(2), 199-276.

Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A. R. **1977**. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74(12), 5463–5467.

Santilli, V. **1958**. Zoospore Morphology of the California Strain of *Plasmopara viticola*. *Nature* 181, 924-925.

Santos, R. F.; Fraaije, B. A.; Garrido, L. da R.; Monteiro-Vitorello, C. B. & Amorim, L. **2020**. Multiple resistance of *Plasmopara viticola* to Qol and CAA fungicides in Brazil. *Plant Pathol*. 69(9), 1708–1720.

Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J.-Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P. & Cardona, A. **2012**. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. methods* 9, 676–682.

Schöpe, N. **2000**. Krankheiten und Schädlinge der Weinrebe. Hrsg.: Schruft, G. & Kassemeyer, H.-H. Staatliches Weinbauinstitut Freiburg i. Br., *AgroConcept* Bonn.

Schröder, S. **2010**. Dissertation. Plant immunity as a result of co-evolution using the pair grapevine / downy mildew as a model. Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Fakultät für Chemie und Biowissenschaften.

Schröder, S.; Telle, S.; Nick, P. & Thines, M. **2011**. Cryptic diversity of *Plasmopara viticola* (Oomycota, Peronosporaceae) in North America. *Org. Divers. Evol*. 11, 3–7.

Schwander, F. **2011**. Dissertation. Identifikation des Mehltauresistenzlocus *Rpv10* für die Rebenzüchtung. Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Fakultät für Chemie und Biowissenschaften.

Schwander, F.; Eibach, R.; Fechter, I.; Hausmann, l.; Zyprian, E. & Töpfer, R. **2012**. *Rpv10*: A new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theor. Appl. Genet*. 124,163–176.

Sefc, K. M.; Pejic, I.; Maletic, E.; Thomas, M. R. & Lefort, F. **2009**. Microsatellite markers for grapevine: tools for cultivar identification & pedigree reconstruction. In: *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Roubelakis-Angelakis, K. A. (ed) 565-596.

Shavrukov, Y. N.; Dry, I. B. & Thomas, M. R. **2004**. Inflorescence and bunch architecture development in *Vitis vinifera* L. *Aust. J. Grape Wine Res.* 10, 116–124.

Shetty, N. P.; Mehrabi, R.; Lütken, H.; Haldrup, A.; Kema, G. H. J.; Collinge, D. B. & Jørgensen H. J. L. **2007**. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytol.* 174, 637 –647.

Simão, F. A.; Waterhouse, R. M.; Ioannidis, P.; Kriventseva, E. V. & Zdobnov, E. M. **2015**. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31(19), 3210–3212.

Slesak, I.; Libik, M.; Karpinska, B.; Karpinski, S. & Miszalski, Z. **2007**. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signaling in response to environmental stresses. *Acta Biochim. Pol.* 54, 39–50.

Šnyrychová, I.; Ayaydin, F. & Hideg, É. **2009**. Detecting hydrogen peroxide in leaves in vivo – a comparison of methods. *Physiologia Plantarum* 135, 1–18.

Solovyev, V. V.; Kosarev, P.; Seledsov, I. & Vorobyev, D. **2006**. Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome biol.* 7(1), S10.

Staatliches Weinbauinstitut Freiburg. **2021**. Pflanzenschutz im Weinbau: Antiresistenzstrategie 2021.

Staudt, G. **& Kassemeyer**, H. H. **1995**. Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis* species. *Vitis* 34(4), 225–228.

Stevens, N. E. **1933**. The dark ages in plant pathology in America: 1830-1870. *Phytopathology* 23(9), 435–446.

Takken, F. L. W. **& Goverse**, A. **2012**. How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15(4), 375–384.

Takken, F. L. W.; Albrecht, M. & Tameling, W. I. L. **2006**. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(4), 383–390.

This, P.; Lacombe, T. & Thomas, M. R. **2006**. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *TIG* 22(9), 511-519.

This, P.; Lacombe, T.; Cadle-Davidson, M. & Owens, C. L. **2007**. Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1. Theor. Appl. Genet.* 114(4), 723–730.

Thomas, C. M.; Jones, D. A.; Parniske, M. A.; Harrison, K. A.; Balint-Kurti, P. J.; Hatzixanthis, K. & Jones, J. D. G. **1997**. Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies a domain which determines recognitional specificity in *Cf-4* and *Cf-9. Plant Cell* 9, 2209–2224.

Thordal-Christensen, H.; Zhang, Z.; Wei, Y. & Collinge, D. B. **1997**. Subcellular localization oh H_2O_2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11(6), 1187–1194.

Ton, J.; Flors, V. & Mauch-Mani, B. **2009**. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 14, 310–317.

Töpfer, R.; Hausmann, L.; Harst, M.; Maul, E.; Zyprian, E. & Eibach, R. **2011a**. New Horizons for Grapevine Breeding. Herausgeber: Flachowsky, H. und Hanke, M. V. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology 5*. Global Science Books. 79-100.

Töpfer, R., Hausmann, L. & Eibach, R. **2011b**. Molecular Breeding. Herausgeber: Adam-Blondon, A. F., Martinez-Zapater, J. M. und C. Kole. *Genetics, Genomics and Breeding of Grapes*. Science Publishers, Enfield, USA. 161-185.

Torres, M. A.; Jones, J. D. & Dangl, J. L. **2006**. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141, 373–378.

Traganos, F.; Darzynkiewicz, Z.; T Sharpless, T. & Melamed, M. R. **1977**. Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. *J. Histochem. & Cytochem.* 25(1), 46-56.

Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B. C.; Remm, M. & Rozen, S. G. **2012**. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic. Acids Res*. 40(15), e115.

Ursache, R.; Andersen, T. G.; Marhavý P. & Geldner, N. **2018**. A protocol for combining fluorescent proteins with histological stains for diverse cell wall components. *Plant J.* 93, 399–412.

Van der Biezen, E. A. **& Jones**, J. D. G. **1998**. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr. Biol.* 8(7), 226–227.

Van Etten, H. D.; Mansfield, J. W.; Bailey, J. A. & Farmer, E. E. **1994**. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins". *Plant Cell* 6, 1991–1992.

Venuti, S.; Copetti, D.; Foria, S.; Falginella, l.; Hoffmann, S.; Bellin, D.; CinDrić, P.; Kozma, P.; Calabrin, S.; Morgante, M.; Testolin, R. & di Gaspero, G. **2013**. Historical introgression of the downy mildew resistance gene *Rpv12* from the Asian pecies *Vitis amurensis* into grapevine varieties. *PLOS ONE* 8(4), e61228.

Viala, P. **1893**. Les Maladies de la vigne. Bibliothèque du Progrès agricole et viticole 3. Edition, Chapitre II – Mildiou, 57-63.

Wainwright, M. **2001**. Acridine—a neglected antibacterial chromophore. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:1–13.

Wan, Y.; Schwaninger, H.; He, P. & Wang, Y. **2007**. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. *Vitis* 46(3), 132–136.

Wan, Y.; Schwaninger, H.; Li, D.; Simon, C. J.; Wang, Y. & He, P. **2008**. The eco-geographic distribution of wild grape germplasm in China. *Vitis* 47, 77–80.

Wang, J.; Ge, Y. X.; Bao, Y. H. **2004**. Comparison of characteristics of *Vitis amurensis* Rupr. varieties. *J. Northeast For. Univ.* (China) 32, 29–31 (chinesisch).

Wang, W.; Wen, Y.; Berkey, R. & Xiao, S. **2009**. Specific Targeting of the *Arabidopsis* Resistance Protein RPW8.2 to the Interfacial Membrane Encasing the Fungal Haustorium Renders Broad-Spectrum Resistance to Powdery Mildew. *Plant Cell* 21(9), 2898–2913.

Waterhouse, R. M.; Seppey, M.; Simão, F. A.; Manni, M.; Ioannidis, P.; Klioutchnikov, G.; Kriventseva, E. V. & Zdobnov, E. M. **2018**. BUSCO Applications from Quality Assessments to Gene Prediction and Phylogenomics. *Mol. Biol. Evol.* 35(3), 543–548.

Weaver, R. J. **1976**. Grape growing. *Wiley Interscience, John Wiley & Sons,* New York, USA.

Wei, H.; Liu, J.; Guo, Q.; Pan, L.; Chai, S.; Cheng, Y.; Ruan, M.; Ye, Q.; Wang, R.; Yao, Z.; Zhou, G. & Wan, H. **2020**. Genomic organization and comparative phylogenic analysis of NBS-LRR resistance gene family in *Solanum pimpinellifolium* and *Arabidopsis thaliana*. *Evol. Bioinform. Online* 16, 1–13.

Welter, L. J.; Göktürk-Baydar, N.; Akkurt, M.; Maul, E.; Eibach, R.; Töpfer, R. & E. M. Zyprian. **2007**. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Mol. Breeding* 20, 359–374.

Werner, S.; Steiner, U.; Becher, R.; Kortekamp, A.; Zyprian, E. & Deising, H. B. **2002**. Chitin synthesis during in planta growth and asexual propagation of the cellulosic oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *FEMS Microbiol. Letters* 208(2), 169–173.

Wilcox, W. F.; Gubler, W. D. & Uyemoto, J. K. **2015**. *Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests - Second Edition.*

Williams, S. J.; Yin, L.; Foley, F.; Casey, L. W.; Outram, M. A.; Ericsson, D. J.; Lu, J.; Boden, M.; Dry, I. B. & Kobe, B. **2016**. Structure and Function of the TIR Domain from the Grape NLR Protein *Rpv1*. *Front. Plant Sci. 7, 1850*.

Wilson, C. L.; Jumper, G. A. & Mason, D. L. **1978**. Acridine orange as a lysosomal marker in fungal spores. *Phytopathology* 68, 1564–1567.

Wohlrab, F **& Fuchs**, U. **1967**. Formazan-Stabilität und –Reoxydation in Gewebsstrukturen unter dem Einfluß elektronenmikroskopischer Präparationstechnik. *Histochemie* 11, 171-179.

Wong, F. P.; Burr, H. N. & Wilcox, W. F. **2001**. Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathol*. 50, 427–432.

Wong, J.; Gao, L.; Yang, Y.; Zhai, J.; Arikit, S.; Yu, Y.; Duan, S.; Chan, V.; Xiong, Q.; Yan, J.; Li, S.; Liu, R.; Wang, Y.; Tang, G.; Meyers, B. C.; Chen, X. & Ma, W. **2014**. Roles of small RNAs in soybean defense against *Phytophthora sojae* infection. *Plant J.* 79, 928-940.

Xiao, S.; Ellwood, S.; Calis, O.; Patrick, E.; Li, T.; Coleman, M. & Turner, J. G. **2001**. Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *RPW8*. *Science* 291(5501), 118–120.

Yu, Y.; Zhang, Y.; Yin, L. & Lu, J. **2012**. The mode of host resistance to *Plasmopara viticola* infection of grapevines. *Phytopathology* 102(11), 1094–1101.

Yu, X.; Feng, B.; He, P. & Shan, L. **2017**. From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 109–137.

Zendler, D. **2018**. Dissertation. Die *Erysiphe necator* Resistenzen *Ren3* und *Ren9* aus 'Regent' – Eingrenzung, Analyse von Kandidatengenen und differentielle Genregulation. Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Fakultät für Chemie und Biowissenschaften.

Zhou, J.; Spallek, T.; Faulkner, C. & Robatzek, S. **2012**. CalloseMeasurer: a novel software solution to measure callose deposition and recognise spreading callose patterns. *Plant Methods* 8, 49.

Zou, C.; Massonnet, M.; Minio, A.; Patel, S.; Llaca, V.; Karn, A.; Gouker, F.; Cadle-Davidson, L.; Reisch, B.; Fennell, A.; Cantu, D.; Sun, Q. & Londo, J. P. **2021**. Multiple independent recombinations led to hermaphroditism in grapevine. *PNAS* 118(15), e2023548118.

Zyprian, E.; Ochßner, I.; Schwander, F.; Šimon, S.; Hausmann, L.; Bonow-Rex, M.; Moreno-Sanz, P.; Grando, M. S.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Merdinoglu, D.; Eibach, R. & Töpfer, R. **2016**. Quantitative trait loci affecting pathogen resistance and ripening of grapevines. *Mol. Genet. Genom.* 291, 1573–1594.

6 Anhang

6.1 Makro für Myzelberechnung mittels Fiji.

Wie in 2.3.11 beschrieben, wurden zur statistischen Auswertung des Myzelwachtsums verschiedener Genotypen zwei Makros für das Programm Fiji erstellt. Dabei wurde für Genotypen, deren Myzelwachstum gut zu erkennen war (`Afus Ali´, `Italia´, `Kunbarat´, `Kunleany´, 2004-043-021, 65-153-18, 2014-099-0003 und DEU098-2006-017) das unter 6.1.1 aufgeführte Makro verwendet. Für die Genotypen Hozy01 und Hozy10 auf Grund des sehr geringen Myzelwachstums das Makros, das unter 6.1.2 aufgeführt ist.

6.1.1 Makro für stärkeres Myzelwachstum

Bei dem Makro für stärkeres Myzelwachstum wurde der blaue Farbkanal verwendet. Hierfür wurden zunächst die Farbkanäle gesplittet und anschließend die Kanäle rot und grün verworfen. Der blaue Kanal wurde dann unter Nutzung des automatischen Schwellwertfilters IJ_IsoData dark analysiert. Die Erstellung des Makros erfolgte mit Unterstützung durch M. Sc. Thomas Proksch.

```
//Dateipfaddialog erstellen, um den Ordnerpfad auszuwaehlen
parDir = getDirectory("Choose a Directory");
if (parDir=="")
exit("No directory available"); //get directory with images
Dialog.create("Saving Options");

//Dateiliste erstellen mit allen Dateien aus ausgewaehltem Ordner
list = getFileList(parDir);

//Programm fuer alle Dateien im Ordner ausfuehren (i(=Index fuer Dateien
in Dateiliste) hochzaehlen)
for (i=0; i<list.length; i++)
{
      //Dateiname festlegen (i-te Datei aus Liste)
      fullName = parDir + list[i];
      //wenn Dateiname auf .jpg endet..
      if (endsWith(fullName, ".jpg"))
            {
            //1. Bild oeffnen und Bildname merken
            open(fullName);
            Bildname = getTitle;

            //2. Farben trennen. Rot und Grün wegwerfen, da Myzel die
groeßten Blauwerte hat und somit ein besserer Kontrast zum Hintergrund
entsteht
            run("Split Channels");
            selectWindow(Bildname + " (red)");
            close();
            selectWindow(Bildname + " (green)");
            close();
```

```
            //3. Kontrast spreizen um Histogramm vollst. auszufuellen
            selectWindow(Bildname + " (blue)");
            getStatistics(area, mean, min, max);
            run("Brightness/Contrast...");
            setMinAndMax(20, max);
            run("Apply LUT");
            run("Close");

            //4. Schwellwertfilter: Alles unter dem (Auto-)Schwellwert
wird schwarz und alles über dem Schwellwert weiß

            setAutoThreshold("IJ_IsoData dark"); // der Autoschwellwert
setzt den Schwellwert zwischen den 2 Maxima (linkes Maximum =
Hintergrund, rechtes Maximum = gesuchtes Objekt)
            setOption("BlackBackground", true);
            run("Convert to Mask");

            //5. Remove Particles: alles entfernen, was kleiner ist als
... zusammenhaengende Pixel
            selectWindow(Bildname + " (blue)");
            run("Analyze Particles...", "size=10000-Infinity show=Masks
clear");
            selectWindow(Bildname + " (blue)");
            close;
            selectWindow("Mask of " + Bildname + " (blue)");
            run("Invert"); // Bild invertieren: sw <-> ws
            run("Analyze      Particles...",      "size=10000-Infinity
show=[Count Masks] summarize");

            //6. Bild abspeichern
            selectWindow("Mask of " + Bildname + " (blue)");
            saveAs("jpg", "D:/ImageJ-Results-Mycelium/" + Bildname);

            //6. Ergebisse in Excel speichern
            selectWindow("Summary");
            saveAs("Results",  "D:/ImageJ-Results-Mycelium/"+  Bildname
+".csv");
            run("Close");
            close();
            close();

      }

}
```

6.1.2 Makro für geringes Myzelwachstum

Bei dem Makro für geringes Myzelwachstum wurde ein Differenzbild erzeugt. Hierfür wurden zunächst die Farbkanäle gesplittet und anschließend der blaue Kanal (Myzel) mit dem roten Kanal (Hintergrund) verrechnet. Als automatischer Schwellwertfilter wurde „Default dark“ verwendet. Die Erstellung des Makros erfolgte mit Unterstützung durch M. Sc. Thomas Proksch.

```
//Dateipfaddialog erstellen, um den Ordnerpfad auszuwaehlen
parDir = getDirectory("Choose a Directory");
if (parDir=="")
exit("No directory available"); //get directory with images
Dialog.create("Saving Options");

//Dateiliste erstellen mit allen Dateien aus ausgewaehltem Ordner
list = getFileList(parDir);

//Programm fuer alle Dateien im Ordner ausfuehren (i(=Index fuer Dateien
in Dateiliste) hochzaehlen)
for (i=0; i<list.length; i++)
{
      //Dateiname festlegen (i-te Datei aus Liste)
      fullName = parDir + list[i];

      //wenn Dateiname auf .jpg endet..
      if (endsWith(fullName, ".jpg"))
      {
            //1. Bild oeffnen und Bildname merken
            open(fullName);
            Bildname = getTitle;

            //2. Farben trennen. Gruen wegwerfen.
                  //da Myzel so gut wie keine Rot-Werte haben (Myzel
sind komplett schwarz im Rotbild) koennen diese ueber ein Differenzbild
(Blau-Rot). somit wird einiges Hintergrund entfernt
            run("Split Channels");

            selectWindow(Bildname + " (green)");
            close();

            // 3. Differenzbild erzeugen
            imageCalculator("Difference create", Bildname + " (red)",
Bildname + " (blue)");
            selectWindow(Bildname + " (red)");
            close();
            selectWindow(Bildname + " (blue)");
            close();
            selectWindow("Result of " + Bildname + " (red)");

            //4. Kontrast spreizen um Histogramm vollst. auszufuellen
            getStatistics(area, mean, min, max);
            run("Brightness/Contrast...");
            setMinAndMax(20, max);
            run("Apply LUT");
            run("Close");

            //5. Schwellwertfilter: Alles unter dem (Auto-)Schwellwert
```

```
wird schwarz und alles über dem Schwellwert weiß
            setAutoThreshold("Default dark"); // der Autoschwellwert
setzt den Schwellwert zwischen den 2 Maxima (linkes Maxima = Hintergrund,
rechtes Maxima = gesuchtes Objekt)
            setOption("BlackBackground", true);
            run("Convert to Mask");

            //6. Remove Particles: alles entfernen, was kleiner ist als
... zusammenhaengende Pixel
            selectWindow("Result of " + Bildname + " (red)");
            run("Analyze Particles...", "size=1000-Infinity show=Masks
clear");
            selectWindow("Result of " + Bildname + " (red)");
            close;
            selectWindow("Mask of Result of " + Bildname + " (red)");
            run("Invert");
            run("Analyze Particles...", "size=1-Infinity show=[Count
Masks] summarize");

            //6. Bild abspeichern
            selectWindow("Mask of Result of " + Bildname + " (red)");
            saveAs("jpg", "D:/ImageJ-Results-Mycelium/" + Bildname);

            //7. Ergebis in Excel speichern
            selectWindow("Summary");
            saveAs("Results", "D:/ImageJ-Results-Mycelium/"+ Bildname
+".csv");
            run("Close");
            close();
            close();

            }
}
```

6.1.3 Makro zum Zusammenführen verschiedener Excel-Output-Dateien

Das Makro wurde verwendet um die Ergebnisse der Fiji-Bildanalyse in einer Datei zusammenzufassen. Das Makro wurde von M. Sc. Thomas Proksch erstellt.

```
Sub Ergebnis()

Dim strPath As String
Dim strFile As String
Dim file As Object
Dim i As Integer
Dim wb As Excel.Workbook


    Set wb = ActiveWorkbook


    strPath = ActiveWorkbook.Path & "\" 'Pfad des Verzeichnisses ggf.
anpassen
    strExt = "*.csv"        'Dateiextension ggf. anpassen


i = 1

    If strPath = "" Then
        Exit Sub
    Else
        strFile = Dir(strPath & strExt)
        Do While Len(strFile) > 0

            Workbooks.Open Filename:=strPath & strFile
           If i = 1 Then
             wb.ActiveSheet.Cells(i, 1).Value =
Workbooks(strFile).ActiveSheet.Cells(1, 1)
             wb.ActiveSheet.Cells(i, 2).Value =
Workbooks(strFile).ActiveSheet.Cells(1, 2)
             wb.ActiveSheet.Cells(i, 3).Value =
Workbooks(strFile).ActiveSheet.Cells(1, 3)
             wb.ActiveSheet.Cells(i, 4).Value =
Workbooks(strFile).ActiveSheet.Cells(1, 4)
             wb.ActiveSheet.Cells(i, 5).Value =
Workbooks(strFile).ActiveSheet.Cells(1, 5)
             wb.ActiveSheet.Cells(i, 6).Value =
Workbooks(strFile).ActiveSheet.Cells(1, 6)
             i = i + 1
            End If
            wb.ActiveSheet.Cells(i, 1).Value =
Workbooks(strFile).ActiveSheet.Cells(2, 1)
            wb.ActiveSheet.Cells(i, 2).Value =
Workbooks(strFile).ActiveSheet.Cells(2, 2)
            wb.ActiveSheet.Cells(i, 3).Value =
Workbooks(strFile).ActiveSheet.Cells(2, 3)
            wb.ActiveSheet.Cells(i, 4).Value =
Workbooks(strFile).ActiveSheet.Cells(2, 4)
            wb.ActiveSheet.Cells(i, 5).Value =
Workbooks(strFile).ActiveSheet.Cells(2, 5)
            wb.ActiveSheet.Cells(i, 6).Value =
Workbooks(strFile).ActiveSheet.Cells(2, 6)
```

```
            Workbooks(strFile).Close (False)
            strFile = Dir() ' nächste Datei
            i = i + 1
        Loop
    End If
End Sub
```

6.2 Abstammungsanalyse von `Kunbarat´ und `Kunleany´

SSR-Marker-Analyse der Verwandtschaft der Genotypen `Kunbarat´, `Kunleany´ und ihrer Nachkommen. Verwendet wurden insgesamt 80 SSR-Marker die neben Loci zur Erfassung der Verwandtschaft (60 SSR-Marker) auch Resistenz- und Geschlechtsloci (20 SSR-Marker) umfassen. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und die Position auf dem Chromosom (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al*., 2017). P_1 und P_2 repräsentieren die Parentaltypen, P_0 den Vorfahren von P_1 und P_2 und F_1 die Nachkommenschaft.

Tabelle 31: Verwandtschaft der Rebsorten `Kunbarat´ und `Kunleany´. Verwendet wurden 60 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und die Position auf dem Chromosom (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). P_1 repräsentiert einen Parentaltyp, $P_{incorrect}$ einen ursprünglich angenommenen Parentaltyp und F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	Afus Ali P_1	Italia $P_{incorrect}$	Kunbarat F_1	Kunleany F_1	Chr.	Position
APT3	268 / 466	268 / 466	268 / 466	268 / 466	02	na
GF02-01	274 / 286	274 / 278	274 / 278	274 / 278	02	4.554.038
GF02-03	262 / 000	262 / 270	262 / 000	262 / 000	02	5.788.718
GF02-55	214 / 216	216 / 000	216 / 000	214 / 216	02	14.110.164
GF02-62	384 / 000	384 / 000	384 / 000	384 / 000	02	14.304.052
UDV-013	103 / 000	097 / 103	103 / 000	103 / 000	16	2.413.589
VMC1A12	131 / 135	119 / 125	131 / 149	125 / 131	07	22.589.377
VMC1B11	183 / 185	173 / 185	169 / 185	169 / 185	08	14.039.245
VMC1E12	234 / 240	242 / 244	224 / 234	224 / 234	14	7.136.672
VMC3A8	163 / 165	163 / 165	163 / 000	163 / 000	06	17.487.116
VMC3C9	251 / 000	247 / 258	245 / 251	249 / 251	08	17.399.458
VMC4f3.1	165 / 187	171 / 206	171 / 187	165 / 171	12	16.417.601
VMC5G8	314 / 318	318 / 000	314 / 318	298 / 318	15	14.895.321
VMC5H11	199 / 000	188 / 199	177 / 199	184 / 199	19	1.241.284
VMC7H3	122 / 000	132 / 000	122 / 134	122 / 134	04	4.719.044
VMC8A7	161 / 169	151 / 155	151 / 161	161 / 169	01	3.423.454
VMC8C2	147 / 000	147 / 149	147 / 000	147 / 000	02	17.627.087
VMC8E8	116 / 000	126 / 000	116 / 000	116 / 000	01	17.429.548
VMC8F10	235 / 000	199 / 235	209 / 235	209 / 235	03	3.324.131
VMC8G6	155 / 000	147 / 155	147 / 155	145 / 155	12	2.354.142
VRZAG21	189 / 213	189 / 199	195 / 213	189 / 195	04	13.794.845
VRZAG62	186 / 188	192 / 204	186 / 194	188 / 194	07	na
VRZAG67	128 / 150	134 / 150	122 / 128	122 / 150	10	5.006.496

Marker	Afus Ali P_1	Italia $P_{incorrect}$	Kunbarat F_1	Kunleany F_1	Chr.	Position
VRZAG79	243 / 251	255 / 257	243 / 253	251 / 253	05	5.692.693
VRZAG83	189 / 195	189 / 195	195 / 000	189 / 000	04	20.654.770
VVIB01	291 / 295	291 / 295	291 / 000	291 / 000	02	2.161.587
VVIB23	287 / 293	287 / 313	287 / 313	287 / 313	02	4.807.391
VVIH54	165 / 177	163 / 187	165 / 177	177 / 181	13	3.434.661
VVIM01	181 / 000	181 / 000	181 / 000	181 / 000	13	6.609.298
VVIM10	366 / 376	366 / 376	366 / 368	368 / 376	18	10.439.542
VVIN16	149 / 000	155 / 157	145 / 149	145 / 149	18	26.361.444
VVIN33	282 / 286	284 / 000	268 / 286	272 / 282	05	11.721.184
VVIN62	358 / 362	362 / 000	362 / 000	358 / 000	13	1.387.838
VVIN73	266 / 000	266 / 000	264 / 266	264 / 266	17	5.636.281
VVIN78	158 / 160	158 / 160	158 / 160	158 / 000	10	10.476.790
VVIN85	354 / 000	354 / 356	354 / 356	354 / 360	10	6.040.628
VVIP02	275 / 000	269 / 275	265 / 275	265 / 275	11	9.136.293
VVIP31	171 / 181	177 / 185	177 / 181	181 / 185	19	6.697.524
VVIP33	392 / 404	392 / 394	404 / 000	404 / 000	15	13.060.296
VVIP60	318 / 000	322 / 000	318 / 324	314 / 318	01	9.196.429
VVIP72	074 / 000	074 / 000	074 / 000	074 / 074	06	2.228.230
VVIQ52	076 / 078	080 / 082	076 / 082	078 / 082	09	21.558.104
VVIQ66	180 / 000	180 / 000	180 / 000	180 / 000	09	10.809.140
VVIV37	148 / 160	168 / 174	148 / 160	148 / 156	10	14.591.116
VVIV67	357 / 361	373 / 375	333 / 357	333 / 357	15	10.897.737
VVMD21	257 / 000	250 / 257	250 / 256	250 / 257	06	14.883.818
VVMD24	206 / 206	206 / 210	206 / 000	206 / 212	14	24.252.056
VVMD25	249 / 255	239 / 249	237 / 249	237 / 249	11	2.971.910
VVMD27	186 / 186	180 / 195	184 / 186	182 / 186	05	4.472.175
VVMD28	234 / 258	234 / 244	258 / 000	258 / 000	03	12.005.584
VVMD31	204 / 212	212 / 214	204 / 204	204 / 212	07	5.255.257
VVMD32	258 / 272	252 / 272	238 / 272	238 / 258	04	18.402.512
VVMD34	000 / 000	000 / 000	000 / 000	000 / 000	02	3.542.454
VVMD5	228 / 234	234 / 240	230 / 234	230 / 234	16	22.305.077
VVMD7	239 / 249	243 / 247	239 / 249	239 / 000	07	1.560.528
VVNTM1	168 / 000	168 / 000	168 / 000	168 / 000	02	14.261.177
VVNTM3	275 / 000	275 / 000	275 / 000	275 / 000	02	14.399.922
VVNTM6	147 / 000	147 / 000	147 / 000	147 / 000	02	14.442.196
VVS19	159 / 000	187 / 000	166 / 000	166 / 000	05	21.887.550
VVS2	133 / 135	133 / 149	129 / 133	129 / 133	11	3.909.894

Tabelle 32: Resistenzloci der Rebsorten `Kunbarat´ und `Kunleany´. Verwendet wurden 20 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und der assoziierte Resistenzlocus (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). P_1 repräsentiert einen Parentaltyp, $P_{incorrect}$ einen ursprünglich angenommenen Parentaltyp und F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	**Afus Ali** P_1	**Italia** $P_{incorrect}$	**Kunbarat** F_1	**Kunleany** F_1	**Chr.**	**Resistenzlocus**
9M3-3	000 / 000	000 / 000	483 / 000	000 / 000	15	*Rcg1*
GF02-31	246 / 259	246 / 259	246 / 259	246 / 259	02	*Sex*
GF09-46	422 / 000	406 / 422	418 / 422	422 / 000	09	*Rpv10*
GF09-48	348 / 000	348 / 000	348 / 000	348 / 000	09	*Rpv10*
GF14-28	160 / 166	168 / 170	150 / 160	150 / 160	14	*Rpv12*
GF15-28	361 / 364	375 / 379	338 / 361	338 / 361	15	*Rcg1 / Ren3*
GF15-30	418 / 442	438 / 466	418 / 446	442 / 000	15	*Rcg1*
GF15-41	257 / 259	259 / 000	259 / 000	257 / 259	15	*Ren3*
GF15-66	353 / 000	353 / 000	353 / 000	000 / 000	15	*Ren9*
GF18-06	385 / 393	375 / 381	385 / 393	385 / 393	18	*Rpv3*
GF18-08	384 / 390	386 / 000	384 / 390	382 / 384	18	*Rpv3*
Sc34_8	224 / 226	228 / 000	226 / 000	224 / 000	12	*Run1*
Sc35_2	244 / 248	248 / 250	248 / 254	244 / 254	12	*Run1*
UDV-015	182 / 000	174 / 180	178 / 000	182 / 000	15	*Rcg1*
UDV-340	176 / 000	191 / 196	176 / 178	178 / 000	14	*Rpv12*
UDV-343	191 / 000	197 / 000	159 / 191	159 / 191	14	*Rpv12*
UDV-380	095 / 103	097 / 000	095 / 103	103 / 000	14	*Rpv12*
UDV-360	203 / 209	197 / 201	203 / 207	207 / 209	14	*Rpv12*
VMC9h4.2	274 / 280	300 / 312	280 / 286	274 / 286	13	*Ren1*
sc36_7	193 / 195	187 / 195	195 / 197	193 / 197	14	*Rpv12*

Tabelle 33: Abstammung der Rebsorte `Petra´. Verwendet wurden 60 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und die Position auf dem Chromosom (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). P_1 und P_2 repräsentieren die Parentaltypen, $P_{incorrect}$ einen ursprünglich angenommenen Parentaltyp und F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	Kunbarat P_1	Savagnin blanc P_2	Pinot Noir $P_{incorrect}$	Petra F_1	Chr.	Position
APT3	268 / 466	268 / 268	268 / 000	268 / 466	02	na
GF02-01	274 / 278	274 / 286	274 / 278	274 / 286	02	4.554.038
GF02-03	262 / 000	270 / 287	287 / 294	262 / 270	02	5.788.718
GF02-55	216 / 000	212 / 214	214 / 228	214 / 216	02	14.110.164
GF02-62	384 / 000	384 / 000	372 / 384	384 / 000	02	14.304.052
UDV-013	103 / 000	103 / 000	000 / 109	103 / 000	16	2.413.589
VMC1A12	131 / 149	119 / 000	119 / 000	119 / 149	07	22.589.377
VMC1B11	169 / 185	171 / 173	167 / 173	173 / 185	08	14.039.245
VMC1E12	224 / 234	234 / 254	254 / 000	224 / 254	14	7.136.672
VMC3A8	163 / 000	163 / 165	165 / 173	163 / 000	06	17.487.116
VMC3C9	245 / 251	258 / 000	258 / 265	245 / 258	08	17.399.458
VMC4f3.1	171 / 187	171 / 177	171 / 177	171 / 177	12	16.417.601
VMC5G8	314 / 318	314 / 318	314 / 318	314 / 314	15	14.895.321
VMC5H11	177 / 199	184 / 197	184 / 201	197 / 199	19	1.241.284
VMC7H3	122 / 134	134 / 000	134 / 000	122 / 134	04	4.719.044
VMC8A7	151 / 161	157 / 000	157 / 000	151 / 157	01	3.423.454
VMC8C2	147 / 000	147 / 000	147 / 000	147 / 000	02	17.627.087
VMC8E8	116 / 000	122 / 128	126 / 128	122 / 000	01	17.429.548
VMC8F10	209 / 235	199 / 235	197 / 199	199 / 209	03	3.324.131
VMC8G6	147 / 155	155 / 169	147 / 169	147 / 169	12	2.354.142
VRZAG21	195 / 213	199 / 205	199 / 205	199 / 213	04	13.794.845
VRZAG62	186 / 194	188 / 194	188 / 194	194 / 194	07	na
VRZAG67	122 / 128	122 / 128	122 / 148	122 / 122	10	5.006.496
VRZAG79	243 / 253	245 / 251	239 / 245	243 / 251	05	5.692.693
VRZAG83	195 / 000	189 / 201	189 / 201	195 / 201	04	20.654.770
VVIB01	291 / 000	289 / 295	289 / 295	291 / 295	02	2.161.587
VVIB23	287 / 313	291 / 293	291 / 313	287 / 293	02	4.807.391
VVIH54	165 / 177	163 / 000	163 / 167	163 / 177	13	3.434.661
VVIM01	181 / 000	181 / 000	181 / 000	181 / 000	13	6.609.298
VVIM10	366 / 368	354 / 366	354 / 368	354 / 368	18	10.439.542
VVIN16	145 / 149	149 / 157	149 / 157	149 / 149	18	26.361.444
VVIN33	268 / 286	284 / 000	284 / 284	286 / 000	05	11.721.184
VVIN62	362 / 000	356 / 362	362 / 000	356 / 000	13	1.387.838
VVIN73	264 / 266	266 / 000	266 / 268	264 / 266	17	5.636.281
VVIN78	158 / 160	158 / 160	158 / 160	158 / 158	10	10.476.790
VVIN85	354 / 356	354 / 364	354 / 364	356 / 364	10	6.040.628
VVIP02	265 / 275	269 / 000	269 / 275	269 / 275	11	9.136.293

Marker	Kunbarat P_1	Savagnin blanc P_2	Pinot Noir $P_{incorrect}$	Petra F_1	Chr.	Position
VVIP31	177 / 181	177 / 191	177 / 181	177 / 181	19	6.697.524
VVIP33	404 / 000	402 / 000	402 / 000	402 / 404	15	13.060.296
VVIP60	318 / 324	306 / 320	318 / 320	306 / 324	01	9.196.429
VVIP72	074 / 000	074 / 000	074 / 087	074 / 000	06	2.228.230
VVIQ52	076 / 082	076 / 082	082 / 000	082 / 082	09	21.558.104
VVIQ66	180 / 000	180 / 000	180 / 000	180 / 000	09	10.809.140
VVIV37	148 / 160	160 / 000	150 / 160	160 / 000	10	14.591.116
VVIV67	333 / 357	365 / 373	365 / 373	357 / 365	15	10.897.737
VVMD21	250 / 256	250 / 000	250 / 000	250 / 000	06	14.883.818
VVMD24	206 / 000	210 / 215	212 / 215	206 / 215	14	24.252.056
VVMD25	237 / 249	249 / 000	239 / 249	237 / 249	11	2.971.910
VVMD27	184 / 186	190 / 000	186 / 190	186 / 190	05	4.472.175
VVMD28	258 / 000	234 / 236	218 / 236	236 / 258	03	12.005.584
VVMD31	204 / 204	204 / 216	216 / 000	204 / 216	07	5.255.257
VVMD32	238 / 272	240 / 272	240 / 272	240 / 272	04	18.402.512
VVMD34	000 / 000	237 / 000	237 / 000	237 / 000	02	3.542.454
VVMD5	230 / 234	234 / 240	230 / 240	230 / 234	16	22.305.077
VVMD7	239 / 249	243 / 257	239 / 243	239 / 257	07	1.560.528
VVNTM1	168 / 000	168 / 000	162 / 168	168 / 000	02	14.261.177
VVNTM3	275 / 000	275 / 000	275 / 299	275 / 000	02	14.399.922
VVNTM6	147 / 000	147 / 000	147 / 000	147 / 000	02	14.442.196
VVS19	166 / 000	166 / 191	166 / 185	166 / 191	05	21.887.550
VVS2	129 / 133	151 / 000	137 / 151	129 / 151	11	3.909.894

Tabelle 34: Resistenzloci der Rebsorte `Petra´. Verwendet wurden 20 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und der assoziierte Resistenzlocus (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017).). P_1 und P_2 repräsentieren die Parentaltypen, $P_{incorrect}$ einen ursprünglich angenommenen Parentaltyp und F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	**Kunbarat P_1**	**Savagnin blanc P_2**	**Pinot Noir $P_{incorrect}$**	**Petra F_1**	**Chr.**	**Resistenzlocus**
9M3-3	483 / 000	000 / 000	000 / 000	000 / 000	15	*Rcg1*
GF02-31	246 / 259	246 / 259	246 / 259	246 / 259	02	*Sex*
GF09-46	418 / 422	422 / 000	422 / 424	418 / 422	09	*Rpv10*
GF09-48	348 / 000	348 / 000	348 / 000	348 / 000	09	*Rpv10*
GF14-28	150 / 160	160 / 180	180 / 192	150 / 180	14	*Rpv12*
GF15-28	338 / 361	368 / 375	368 / 375	361 / 368	15	*Rcg1 / Ren3*
GF15-30	418 / 446	438 / 466	438 / 466	418 / 438	15	*Rcg1*
GF15-41	259 / 000	259 / 000	259 / 000	259 / 000	15	*Ren3*
GF15-66	353 / 000	353 / 000	353 / 000	353 / 000	15	*Ren9*
GF18-06	385 / 393	375 / 000	375 / 000	375 / 385	18	*Rpv3*
GF18-08	384 / 390	384 / 386	386 / 000	384 / 390	18	*Rpv3*
Sc34_8	226 / 000	224 / 244	224 / 244	224 / 000	12	*Run1*
Sc35_2	248 / 254	246 / 248	244 / 246	248 / 254	12	*Run1*
UDV-015	178 / 000	174 / 180	174 / 180	180 / 000	15	*Rcg1*
UDV-340	176 / 178	176 / 000	176 / 000	178 / 000	14	*Rpv12*
UDV-343	159 / 191	213 / 000	213 / 000	159 / 213	14	*Rpv12*
UDV-380	095 / 103	097 / 000	097 / 000	097 / 103	14	*Rpv12*
UDV-360	203 / 207	188 / 201	201 / 000	201 / 207	14	*Rpv12*
VMC9h4.2	280 / 286	310 / 312	286 / 312	286 / 310	13	*Ren1*
sc36_7	195 / 197	191 / 205	191 / 000	191 / 197	14	*Rpv12*

Tabelle 35: Abstammung des Genotyps `Sremski Karlovci 77 4-5´. Verwendet wurden 60 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und die Position auf dem Chromosom (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). P_1 und P_2 repräsentieren die Parentaltypen und F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	**Kunbarat** **P_1**	**Savagnin blanc** **P_2**	**Sremski Karlovci 77 4-5** **F_1**	**Chr.**	**Position**
APT3	268 / 466	268 / 268	268 / 268	02	na
GF02-01	274 / 278	274 / 286	274 / 278	02	4.554.038
GF02-03	262 / 000	270 / 287	262 / 270	02	5.788.718
GF02-55	216 / 000	212 / 214	214 / 216	02	14.110.164
GF02-62	384 / 000	384 / 000	384 / 000	02	14.304.052
UDV-013	103 / 000	103 / 000	103 / 000	16	2.413.589
VMC1A12	131 / 149	119 / 000	119 / 149	07	22.589.377
VMC1B11	169 / 185	171 / 173	173 / 185	08	14.039.245
VMC1E12	224 / 234	234 / 254	224 / 254	14	7.136.672
VMC3A8	163 / 000	163 / 165	000 / 165	06	17.487.116
VMC3C9	245 / 251	258 / 000	251 / 258	08	17.399.458
VMC4f3.1	171 / 187	171 / 177	171 / 171	12	16.417.601
VMC5G8	314 / 318	314 / 318	318 / 318	15	14.895.321
VMC5H11	177 / 199	184 / 197	197 / 199	19	1.241.284
VMC7H3	122 / 134	134 / 000	134 / 000	04	4.719.044
VMC8A7	151 / 161	157 / 000	151 / 157	01	3.423.454
VMC8C2	147 / 000	147 / 000	147 / 000	02	17.627.087
VMC8E8	116 / 000	122 / 128	122 / 000	01	17.429.548
VMC8F10	209 / 235	199 / 235	209 / 235	03	3.324.131
VMC8G6	147 / 155	155 / 169	147 / 155	12	2.354.142
VRZAG21	195 / 213	199 / 205	195 / 205	04	13.794.845
VRZAG62	186 / 194	188 / 194	194 / 194	07	na
VRZAG67	122 / 128	122 / 128	128 / 128	10	5.006.496
VRZAG79	243 / 253	245 / 251	251 / 253	05	5.692.693
VRZAG83	195 / 000	189 / 201	189 / 000	04	20.654.770
VVIB01	291 / 000	289 / 295	289 / 291	02	2.161.587
VVIB23	287 / 313	291 / 293	291 / 313	02	4.807.391
VVIH54	165 / 177	163 / 000	163 / 177	13	3.434.661
VVIM01	181 / 000	181 / 000	000 / 000	13	6.609.298
VVIM10	366 / 368	354 / 366	354 / 366	18	10.439.542
VVIN16	145 / 149	149 / 157	149 / 157	18	26.361.444
VVIN33	268 / 286	284 / 000	268 / 284	05	11.721.184
VVIN62	362 / 000	356 / 362	356 / 000	13	1.387.838
VVIN73	264 / 266	266 / 000	266 / 000	17	5.636.281
VVIN78	158 / 160	158 / 160	160 / 160	10	10.476.790
VVIN85	354 / 356	354 / 364	354 / 354	10	6.040.628

Marker	Kunbarat P_1	Savagnin blanc P_2	Sremski Karlovci 77 4-5 F_1	Chr.	Position
VVIP02	265 / 275	269 / 000	265 / 269	11	9.136.293
VVIP31	177 / 181	177 / 191	181 / 191	19	6.697.524
VVIP33	404 / 000	402 / 000	000 / 000	15	13.060.296
VVIP60	318 / 324	306 / 320	306 / 324	01	9.196.429
VVIP72	074 / 000	074 / 000	074 / 000	06	2.228.230
VVIQ52	076 / 082	076 / 082	076 / 082	09	21.558.104
VVIQ66	180 / 000	180 / 000	180 / 000	09	10.809.140
VVIV37	148 / 160	160 / 000	148 / 160	10	14.591.116
VVIV67	333 / 357	365 / 373	357 / 373	15	10.897.737
VVMD21	250 / 256	250 / 000	250 / 256	06	14.883.818
VVMD24	206 / 000	210 / 215	206 / 210	14	24.252.056
VVMD25	237 / 249	249 / 000	249 / 000	11	2.971.910
VVMD27	184 / 186	190 / 000	184 / 190	05	4.472.175
VVMD28	258 / 000	234 / 236	236 / 258	03	12.005.584
VVMD31	204 / 204	204 / 216	204 / 204	07	5.255.257
VVMD32	238 / 272	240 / 272	238 / 272	04	18.402.512
VVMD34	000 / 000	237 / 000	237 / 000	02	3.542.454
VVMD5	230 / 234	234 / 240	240 / 234	16	22.305.077
VVMD7	239 / 249	243 / 257	239 / 257	07	1.560.528
VVNTM1	168 / 000	168 / 000	168 / 000	02	14.261.177
VVNTM3	275 / 000	275 / 000	275 / 000	02	14.399.922
VVNTM6	147 / 000	147 / 000	147 / 000	02	14.442.196
VVS19	166 / 000	166 / 191	166 / 000	05	21.887.550
VVS2	129 / 133	151 / 000	133 / 151	11	3.909.894

Tabelle 36: Resistenzloci des Genotyps `Sremski Karlovci 77 4-5´. Verwendet wurden 20 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und der assoziierte Resistenzlocus (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). P_1 und P_2 repräsentieren die Parentaltypen und F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	Kunbarat P_1	Savagnin blanc P_2	Sremski Karlovci 77 4-5 F_1	Chr.	Resistenzlocus
9M3-3	483 / 000	000 / 000	000 / 000	15	*Rcg1*
GF02-31	246 / 259	246 / 259	246 / 259	02	*Sex*
GF09-46	418 / 422	422 / 000	422 / 000	09	*Rpv10*
GF09-48	348 / 000	348 / 000	348 / 000	09	*Rpv10*
GF14-28	150 / 160	160 / 180	150 / 180	14	*Rpv12*
GF15-28	338 / 361	368 / 375	361 / 375	15	*Rcg1 / Ren3*
GF15-30	418 / 446	438 / 466	418 / 466	15	*Rcg1*
GF15-41	259 / 000	259 / 000	259 / 000	15	*Ren3*
GF15-66	353 / 000	353 / 000	353 / 000	15	*Ren9*
GF18-06	385 / 393	375 / 000	375 / 385	18	*Rpv3*
GF18-08	384 / 390	384 / 386	386 / 390	18	*Rpv3*
Sc34_8	226 / 000	224 / 244	224 / 000	12	*Run1*
Sc35_2	248 / 254	246 / 248	246 / 254	12	*Run1*
UDV-015	178 / 000	174 / 180	174 / 000	15	*Rcg1*
UDV-340	176 / 178	176 / 000	178 / 000	14	*Rpv12*
UDV-343	159 / 191	213 / 000	159 / 213	14	*Rpv12*
UDV-380	095 / 103	097 / 000	097 / 103	14	*Rpv12*
UDV-360	203 / 207	188 / 201	201 / 207	14	*Rpv12*
VMC9h4.2	280 / 286	310 / 312	286 / 312	13	*Ren1*
sc36_7	195 / 197	191 / 205	191 / 197	14	*Rpv12*

Tabelle 37: Abstammung der Rebsorten `Rani Rizling´ und `Lela´. Verwendet wurden 60 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und die Position auf dem Chromosom (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). P_1 und P_2 repräsentieren die Parentaltypen und F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	Kunbarat P_1	Welschriesling P_2	Rani Rizling F_1	Lela F_1	Chr.	Position
APT3	268 / 466	268 / 466	466 / 466	268 / 466	02	na
GF02-01	274 / 278	274 / 298	274 / 274	274 / 278	02	4.554.038
GF02-03	262 / 000	274 / 294	262 / 274	262 / 294	02	5.788.718
GF02-55	216 / 000	214 / 216	214 / 216	216 / 000	02	14.110.164
GF02-62	384 / 000	384 / 000	384 / 000	384 / 000	02	14.304.052
UDV-013	103 / 000	103 / 000	103 / 000	103 / 000	16	2.413.589

Marker	Kunbarat P_1	Welschriesling P_2	Rani Rizling F_1	Lela F_1	Chr.	Position
VMC1A12	131 / 149	119 / 121	119 / 149	121 / 149	07	22.589.377
VMC1B11	169 / 185	171 / 183	169 / 171	169 / 171	08	14.039.245
VMC1E12	224 / 234	254 / 000	234 / 254	224 / 254	14	7.136.672
VMC3A8	163 / 000	163 / 165	000 / 165	163 / 165	06	17.487.116
VMC3C9	245 / 251	251 / 261	245 / 251	245 / 251	08	17.399.458
VMC4f3.1	171 / 187	171 / 000	171 / 187	171 / 187	12	16.417.601
VMC5G8	314 / 318	304 / 306	304 / 314	306 / 318	15	14.895.321
VMC5H11	177 / 199	184 / 197	184 / 199	184 / 199	19	1.241.284
VMC7H3	122 / 134	134 / 000	134 / 000	122 / 000	04	4.719.044
VMC8A7	151 / 161	159 / 000	151 / 159	159 / 161	01	3.423.454
VMC8C2	147 / 000	143 / 147	147 / 147	143 / 147	02	17.627.087
VMC8E8	116 / 000	122 / 128	128 / 000	116 / 128	01	17.429.548
VMC8F10	209 / 235	197 / 199	199 / 235	199 / 209	03	3.324.131
VMC8G6	147 / 155	165 / 169	147 / 169	155 / 165	12	2.354.142
VRZAG21	195 / 213	189 / 205	195 / 205	195 / 205	04	13.794.845
VRZAG62	186 / 194	194 / 196	194 / 196	186 / 194	07	na
VRZAG67	122 / 128	134 / 000	128 / 134	128 / 134	10	5.006.496
VRZAG79	243 / 253	251 / 000	243 / 251	251 / 253	05	5.692.693
VRZAG83	195 / 000	189 / 195	000 / 189	189 / 000	04	20.654.770
VVIB01	291 / 000	291 / 299	291 / 000	291 / 000	02	2.161.587
VVIB23	287 / 313	287 / 305	287 / 287	287 / 313	02	4.807.391
VVIH54	165 / 177	163 / 167	163 / 177	163 / 177	13	3.434.661
VVIM01	181 / 000	181 / 000	181 / 000	181 / 000	13	6.609.298
VVIM10	366 / 368	354 / 366	366 / 368	366 / 366	18	10.439.542
VVIN16	145 / 149	149 / 151	145 / 149	145 / 149	18	26.361.444
VVIN33	268 / 286	280 / 282	268 / 280	268 / 280	05	11.721.184
VVIN62	362 / 000	360 / 362	362 / 000	360 / 000	13	1.387.838
VVIN73	264 / 266	266 / 000	264 / 266	264 / 266	17	5.636.281
VVIN78	158 / 160	160 / 000	160 / 000	158 / 160	10	10.476.790
VVIN85	354 / 356	354 / 000	354 / 000	354 / 000	10	6.040.628
VVIP02	265 / 275	273 / 275	265 / 275	265 / 275	11	9.136.293
VVIP31	177 / 181	171 / 173	171 / 181	171 / 181	19	6.697.524
VVIP33	404 / 000	402 / 410	402 / 404	404 / 410	15	13.060.296
VVIP60	318 / 324	318 / 322	322 / 324	318 / 318	01	9.196.429
VVIP72	074 / 000	074 / 087	074 / 000	087 / 000	06	2.228.230
VVIQ52	076 / 082	076 / 082	076 / 082	076 / 082	09	21.558.104
VVIQ66	180 / 000	178 / 180	180 / 000	178 / 180	09	10.809.140
VVIV37	148 / 160	150 / 160	148 / 160	160 / 160	10	14.591.116
VVIV67	333 / 357	361 / 365	333 / 365	357 / 361	15	10.897.737
VVMD21	250 / 256	250 / 000	250 / 256	250 / 256	06	14.883.818
VVMD24	206 / 000	210 / 215	206 / 215	206 / 215	14	24.252.056
VVMD25	237 / 249	255 / 269	249 / 255	237 / 255	11	2.971.910

Marker	Kunbarat P_1	Welschriesling P_2	Rani Rizling F_1	Lela F_1	Chr.	Position
VVMD27	184 / 186	186 / 190	186 / 190	184 / 190	05	4.472.175
VVMD28	258 / 000	246 / 258	258 / 000	258 / 000	03	12.005.584
VVMD31	204 / 204	212 / 216	204 / 216	204 / 216	07	5.255.257
VVMD32	238 / 272	240 / 272	238 / 272	238 / 272	04	18.402.512
VVMD34	000 / 000	237 / 239	237 / 000	237 / 000	02	3.542.454
VVMD5	230 / 234	228 / 240	234 / 240	230 / 240	16	22.305.077
VVMD7	239 / 249	247 / 257	239 / 247	249 / 257	07	1.560.528
VVNTM1	168 / 000	168 / 000	168 / 000	168 / 000	02	14.261.177
VVNTM3	275 / 000	275 / 000	275 / 000	275 / 000	02	14.399.922
VVNTM6	147 / 000	147 / 000	147 / 000	147 / 000	02	14.442.196
VVS19	166 / 000	185 / 000	185 / 000	166 / 185	05	21.887.550
VVS2	129 / 133	135 / 151	129 / 135	129 / 135	11	3.909.894

Tabelle 38: Resistenzloci der Rebsorten `Rani Rizling´ und `Lela´. Verwendet wurden 20 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und der assoziierte Resistenzlocus (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). P_1 und P_2 repräsentieren die Parentaltypen und F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	**Kunbarat P_1**	**Welschriesling P_2**	**Rani Rizling F_1**	**Lela F_1**	**Chr.**	**Resistenzlocus**
9M3-3	483 / 000	000 / 000	483 / 000	000 / 000	15	*Rcg1*
GF02-31	246 / 259	246 / 259	259 / 259	246 / 259	02	*Sex*
GF09-46	418 / 422	422 / 424	418 / 422	422 / 424	09	*Rpv10*
GF09-48	348 / 000	348 / 000	348 / 000	348 / 000	09	*Rpv10*
GF14-28	150 / 160	176 / 180	160 / 180	150 / 180	14	*Rpv12*
GF15-28	338 / 361	365 / 368	338 / 368	361 / 365	15	*Rcg1 / Ren3*
GF15-30	418 / 446	438 / 446	438 / 446	418 / 446	15	*Rcg1*
GF15-41	259 / 000	259 / 259	259 / 000	259 / 000	15	*Ren3*
GF15-66	353 / 000	000 / 000	000 / 000	353 / 000	15	*Ren9*
GF18-06	385 / 393	385 / 000	385 / 393	385 / 393	18	*Rpv3*
GF18-08	384 / 390	384 / 390	384 / 384	384 / 384	18	*Rpv3*
Sc34_8	226 / 000	224 / 000	224 / 000	224 / 226	12	*Run1*
Sc35_2	248 / 254	246 / 000	246 / 248	246 / 248	12	*Run1*
UDV-015	178 / 000	164 / 180	178 / 180	164 / 000	15	*Rcg1*
UDV-340	176 / 178	176 / 000	176 / 000	178 / 000	14	*Rpv12*
UDV-343	159 / 191	213 / 213	191 / 213	159 / 213	14	*Rpv12*
UDV-380	095 / 103	097 / 103	095 / 097	103 / 103	14	*Rpv12*
UDV-360	203 / 207	201 / 209	201 / 203	207 / 209	14	*Rpv12*
VMC9h4.2	280 / 286	274 / 294	286 / 294	286 / 294	13	*Ren1*
sc36_7	195 / 197	191 / 201	191 / 195	197 / 201	14	*Rpv12*

Tabelle 39: Abstammung des Genotyps `Kozma Csft 2423´. Verwendet wurden 60 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und die Position auf dem Chromosom (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). P_1 repräsentiert den bekannten Parentaltypen, P_0 die Vorfahren von P_2, dessen Genmaterial für die Analyse nicht vorlag und F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	Pannonia Kincse P_0	Seyval P_0	Kunbarat P_1	Kozma Csft 2423 F_1	Chr.	Position
APT3	466 / 466	338 / 466	268 / 466	268 / 466	02	na
GF02-01	274 / 000	274 / 000	274 / 278	274 / 278	02	4.554.038
GF02-03	262 / 274	262 / 274	262 / 000	262 / 000	02	5.788.718
GF02-55	216 / 000	216 / 000	216 / 000	216 / 000	02	14.110.164
GF02-62	384 / 000	384 / 000	384 / 000	384 / 000	02	14.304.052
UDV-013	000 / 000	000 / 000	103 / 000	103 / 000	16	2.413.589
VMC1A12	131 / 149	119 / 121	131 / 149	131 / 149	07	22.589.377
VMC1B11	175 / 185	173 / 000	169 / 185	169 / 185	08	14.039.245
VMC1E12	254 / 000	230 / 240	224 / 234	234 / 254	14	7.136.672
VMC3A8	165 / 000	165 / 000	163 / 000	163 / 165	06	17.487.116
VMC3C9	251 / 000	251 / 263	245 / 251	245 / 251	08	17.399.458
VMC4f3.1	165 / 171	169 / 179	171 / 187	171 / 179	12	16.417.601
VMC5G8	314 / 318	308 / 314	314 / 318	314 / 318	15	14.895.321
VMC5H11	184 / 199	193 / 000	177 / 199	193 / 199	19	1.241.284
VMC7H3	122 / 134	134 / 000	122 / 134	134 / 000	04	4.719.044
VMC8A7	157 / 000	153 / 159	151 / 161	151 / 153	01	3.423.454
VMC8C2	147 / 000	147 / 000	147 / 000	147 / 000	02	17.627.087
VMC8E8	116 / 126	116 / 000	116 / 000	000 / 000	01	17.429.548
VMC8F10	199 / 235	209 / 235	209 / 235	209 / 235	03	3.324.131
VMC8G6	155 / 000	135 / 000	147 / 155	135 / 155	12	2.354.142
VRZAG21	199 / 213	201 / 205	195 / 213	195 / 201	04	13.794.845
VRZAG62	186 / 188	180 / 188	186 / 194	188 / 194	07	na
VRZAG67	122 / 150	134 / 000	122 / 128	122 / 134	10	5.006.496
VRZAG79	251 / 257	259 / 261	243 / 253	243 / 261	05	5.692.693
VRZAG83	195 / 201	189 / 201	195 / 000	201 / 000	04	20.654.770
VVIB01	291 / 295	285 / 291	291 / 000	285 / 291	02	2.161.587
VVIB23	287 / 000	287 / 000	287 / 313	287 / 313	02	4.807.391
VVIH54	165 / 167	157 / 165	165 / 177	165 / 000	13	3.434.661
VVIM01	181 / 000	177 / 181	181 / 000	181 / 000	13	6.609.298
VVIM10	376 / 000	368 / 376	366 / 368	366 / 376	18	10.439.542
VVIN16	149 / 157	145 / 147	145 / 149	145 / 157	18	26.361.444
VVIN33	286 / 000	278 / 302	268 / 286	278 / 286	05	11.721.184
VVIN62	362 / 000	362 / 000	362 / 000	362 / 000	13	1.387.838
VVIN73	266 / 000	256 / 000	264 / 266	256 / 264	17	5.636.281

Marker	Pannonia Kincse P_0	Seyval P_0	Kunbarat P_1	Kozma Csft 2423 F_1	Chr.	Position
VVIN78	158 / 000	160 / 000	158 / 160	158 / 160	10	10.476.790
VVIN85	354 / 356	354 / 362	354 / 356	354 / 356	10	6.040.628
VVIP02	275 / 000	271 / 275	265 / 275	275 / 000	11	9.136.293
VVIP31	171 / 191	175 / 183	177 / 181	175 / 177	19	6.697.524
VVIP33	394 / 402	000 / 000	404 / 000	404 / 000	15	13.060.296
VVIP60	318 / 000	322 / 000	318 / 324	322 / 324	01	9.196.429
VVIP72	074 / 000	087 / 000	074 / 000	087 / 000	06	2.228.230
VVIQ52	078 / 000	078 / 082	076 / 082	078 / 082	09	21.558.104
VVIQ66	180 / 000	180 / 000	180 / 000	180 / 000	09	10.809.140
VVIV37	148 / 150	152 / 168	148 / 160	160 / 168	10	14.591.116
VVIV67	361 / 375	337 / 000	333 / 357	333 / 337	15	10.897.737
VVMD21	266 / 000	244 / 000	250 / 256	250 / 000	06	14.883.818
VVMD24	206 / 000	204 / 210	206 / 000	206 / 000	14	24.252.056
VVMD25	241 / 255	237 / 000	237 / 249	241 / 249	11	2.971.910
VVMD27	186 / 195	190 / 000	184 / 186	186 / 190	05	4.472.175
VVMD28	234 / 268	236 / 252	258 / 000	236 / 258	03	12.005.584
VVMD31	204 / 212	212 / 220	204 / 204	204 / 204	07	5.255.257
VVMD32	240 / 272	250 / 272	238 / 272	238 / 250	04	18.402.512
VVMD34	237 / 000	237 / 241	000 / 000	237 / 000	02	3.542.454
VVMD5	230 / 238	228 / 000	230 / 234	234 / 238	16	22.305.077
VVMD7	243 / 249	237 / 243	239 / 249	239 / 243	07	1.560.528
VVNTM1	168 / 000	168 / 000	168 / 000	168 / 000	02	14.261.177
VVNTM3	275 / 000	275 / 000	275 / 000	275 / 000	02	14.399.922
VVNTM6	147 / 000	147 / 000	147 / 000	147 / 000	02	14.442.196
VVS19	166 / 000	161 / 000	166 / 000	000 / 000	05	21.887.550
VVS2	133 / 143	133 / 000	129 / 133	133 / 000	11	3.909.894

Tabelle 40: Resistenzloci des Genotyps `Kozma Csft 2423´. Verwendet wurden 20 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und der assoziierte Resistenzlocus (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). P_1 repräsentiert den bekannten Parentaltypen, P_0 die Vorfahren von P_2, dessen Genmaterial für die Analyse nicht vorlag und F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	Pannonia Kincse P_0	Seyval P_0	Kunbarat P_1	Kozma Csft 2423 F_1	Chr.	Resistenzlocus
9M3-3	000 / 000	000 / 000	483 / 000	483 / 000	15	*Rcg1*
GF02-31	259 / 000	246 / 259	246 / 259	246 / 259	02	*Sex*
GF09-46	422 / 000	406 / 422	418 / 422	406 / 418	09	*Rpv10*

GF09-48	348 / 000	348 / 356	348 / 000	348 / 356	09	*Rpv10*
GF14-28	180 / 192	156 / 166	150 / 160	160 / 180	14	*Rpv12*
GF15-28	365 / 379	342 / 000	338 / 361	338 / 342	15	*Rcg1 / Ren3*
GF15-30	438 / 442	450 / 000	418 / 446	446 / 450	15	*Rcg1*
GF15-41	257 / 259	263 / 000	259 / 000	259 / 263	15	*Ren3*
GF15-66	000 / 000	329 / 000	353 / 000	329 / 000	15	*Ren9*
GF18-06	375 / 385	375 / 000	385 / 393	375 / 393	18	*Rpv3*
GF18-08	384 / 386	386 / 000	384 / 390	384 / 386	18	*Rpv3*
Sc34_8	224 / 000	000 / 000	226 / 000	000 / 000	12	*Run1*
Sc35_2	248 / 250	258 / 000	248 / 254	254 / 258	12	*Run1*
UDV-015	180 / 182	186 / 000	178 / 000	178 / 186	15	*Rcg1*
UDV-340	176 / 000	176 / 000	176 / 178	176 / 000	14	*Rpv12*
UDV-343	213 / 000	185 / 217	159 / 191	191 / 217	14	*Rpv12*
UDV-380	097 / 000	097 / 103	095 / 103	095 / 097	14	*Rpv12*
UDV-360	201 / 000	181 / 209	203 / 207	203 / 209	14	*Rpv12*
VMC9h4.2	280 / 312	268 / 280	280 / 286	280 / 000	13	*Ren1*
sc36_7	191 / 000	205 / 209	195 / 197	195 / 205	14	*Rpv12*

Tabelle 41: Abstammung der Rebsorte `Mila´. Verwendet wurden 60 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und die Position auf dem Chromosom (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). P_1 und P_2 repräsentieren die Parentaltypen, F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	Kunleany P_1	Muscat Ottonel P_2	Mila F_1	Chr.	Position
APT3	268 / 466	268 / 466	268 / 466	02	na
GF02-01	274 / 278	274 / 286	274 / 286	02	4.554.038
GF02-03	262 / 000	270 / 286	262 / 270	02	5.788.718
GF02-55	214 / 216	214 / 216	214 / 214	02	14.110.164
GF02-62	384 / 000	384 / 000	384 / 000	02	14.304.052
UDV-013	103 / 000	099 / 109	099 / 103	16	2.413.589
VMC1A12	125 / 131	119 / 161	125 / 161	07	22.589.377
VMC1B11	169 / 185	173 / 185	169 / 185	08	14.039.245
VMC1E12	224 / 234	254 / 000	224 / 254	14	7.136.672
VMC3A8	163 / 000	165 / 169	163 / 165	06	17.487.116
VMC3C9	249 / 251	258 / 265	249 / 265	08	17.399.458
VMC4f3.1	165 / 171	171 / 206	171 / 206	12	16.417.601
VMC5G8	298 / 318	304 / 318	298 / 318	15	14.895.321
VMC5H11	184 / 199	184 / 199	184 / 199	19	1.241.284
VMC7H3	122 / 134	134 / 000	122 / 134	04	4.719.044
VMC8A7	161 / 169	161 / 165	161 / 161	01	3.423.454
VMC8C2	147 / 000	147 / 149	147 / 149	02	17.627.087
VMC8E8	116 / 000	126 / 000	126 / 000	01	17.429.548
VMC8F10	209 / 235	199 / 215	209 / 215	03	3.324.131
VMC8G6	145 / 155	147 / 169	145 / 147	12	2.354.142
VRZAG21	189 / 195	205 / 000	189 / 205	04	13.794.845
VRZAG62	188 / 194	186 / 194	186 / 194	07	na
VRZAG67	122 / 150	134 / 148	148 / 150	10	5.006.496
VRZAG79	251 / 253	255 / 259	253 / 255	05	5.692.693
VRZAG83	189 / 000	191 / 201	189 / 201	04	20.654.770
VVIB01	291 / 000	295 / 000	291 / 295	02	2.161.587
VVIB23	287 / 313	287 / 293	287 / 293	02	4.807.391
VVIH54	177 / 181	163 / 167	167 / 177	13	3.434.661
VVIM01	181 / 000	181 / 000	181 / 000	13	6.609.298
VVIM10	368 / 376	354 / 366	366 / 368	18	10.439.542
VVIN16	145 / 149	147 / 157	147 / 149	18	26.361.444
VVIN33	272 / 282	278 / 282	272 / 282	05	11.721.184
VVIN62	358 / 000	356 / 358	358 / 000	13	1.387.838
VVIN73	264 / 266	264 / 266	266 / 266	17	5.636.281
VVIN78	158 / 000	158 / 000	158 / 000	10	10.476.790
VVIN85	354 / 360	354 / 000	354 / 000	10	6.040.628

Marker	Kunleany P_1	Muscat Ottonel P_2	Mila F_1	Chr.	Position
VVIP02	265 / 275	275 / 275	265 / 275	11	9.136.293
VVIP31	181 / 185	181 / 191	185 / 191	19	6.697.524
VVIP33	404 / 000	394 / 402	402 / 404	15	13.060.296
VVIP60	314 / 318	318 / 322	314 / 322	01	9.196.429
VVIP72	074 / 074	074 / 000	074 / 000	06	2.228.230
VVIQ52	078 / 082	082 / 000	078 / 082	09	21.558.104
VVIQ66	180 / 000	180 / 182	180 / 182	09	10.809.140
VVIV37	148 / 156	160 / 000	148 / 160	10	14.591.116
VVIV67	333 / 357	363 / 373	333 / 373	15	10.897.737
VVMD21	250 / 257	266 / 000	250 / 266	06	14.883.818
VVMD24	206 / 212	210 / 000	210 / 212	14	24.252.056
VVMD25	237 / 249	249 / 255	249 / 255	11	2.971.910
VVMD27	182 / 186	180 / 190	180 / 182	05	4.472.175
VVMD28	258 / 000	258 / 268	258 / 268	03	12.005.584
VVMD31	204 / 212	212 / 216	204 / 212	07	5.255.257
VVMD32	238 / 258	240 / 264	258 / 264	04	18.402.512
VVMD34	000 / 000	237 / 000	237 / 000	02	3.542.454
VVMD5	230 / 234	228 / 230	230 / 230	16	22.305.077
VVMD7	239 / 000	239 / 243	239 / 243	07	1.560.528
VVNTM1	168 / 000	168 / 000	168 / 000	02	14.261.177
VVNTM3	275 / 000	275 / 000	275 / 000	02	14.399.922
VVNTM6	147 / 000	147 / 000	147 / 000	02	14.442.196
VVS19	166 / 000	161 / 166	166 / 000	05	21.887.550
VVS2	129 / 133	133 / 143	129 / 143	11	3.909.894

Tabelle 42: Resistenzloci der Rebsorte `Mila´. Verwendet wurden 20 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und der assoziierte Resistenzlocus (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). P_1 und P_2 repräsentieren die Parentaltypen und F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	**Kunleany** P_1	**Muscat Ottonel** P_2	**Mila** F_1	**Chr.**	**Position**
9M3-3	000 / 000	000 / 000	000 / 000	15	*Rcg1*
GF02-31	246 / 259	246 / 259	246 / 259	02	*Sex*
GF09-46	422 / 000	394 / 424	422 / 424	09	*Rpv10*
GF09-48	348 / 000	348 / 000	348 / 000	09	*Rpv10*
GF14-28	150 / 160	180 / 192	150 / 180	14	*Rpv12*
GF15-28	338 / 361	366 / 375	338 / 375	15	*Rcg1 / Ren3*
GF15-30	442 / 000	418 / 438	438 / 000	15	*Rcg1*
GF15-41	257 / 259	259 / 000	259 / 000	15	*Ren3*
GF15-66	000 / 000	000 / 000	000 / 000	15	*Ren9*
GF18-06	385 / 393	375 / 387	385 / 387	18	*Rpv3*
GF18-08	382 / 384	384 / 386	384 / 384	18	*Rpv3*
Sc34_8	224 / 000	228 / 000	228 / 000	12	*Run1*
Sc35_2	244 / 254	246 / 250	250 / 254	12	*Run1*
UDV-015	182 / 000	180 / 000	180 / 182	15	*Rcg1*
UDV-340	178 / 000	176 / 000	178 / 000	14	*Rpv12*
UDV-343	159 / 191	213 / 000	159 / 213	14	*Rpv12*
UDV-380	103 / 000	097 / 000	097 / 103	14	*Rpv12*
UDV-360	207 / 209	201 / 000	201 / 207	14	*Rpv12*
VMC9h4.2	274 / 286	286 / 312	286 / 286	13	*Ren1*
sc36_7	193 / 197	191 / 000	191 / 197	14	*Rpv12*

Tabelle 43: Abstammung der Rebsorte `Zlata´. Verwendet wurden 60 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und die Position auf dem Chromosom (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). P_1 und P_2 repräsentieren die Parentaltypen und F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	**Kunleany** P_1	**Irsai Oliver** P_2	**Zlata** F_1	**Chr.**	**Position**
APT3	268 / 466	268 / 466	466 / 466	02	na
GF02-01	274 / 278	274 / 278	274 / 274	02	4.554.038
GF02-03	262 / 000	274 / 000	262 / 274	02	5.788.718
GF02-55	214 / 216	214 / 216	214 / 214	02	14.110.164
GF02-62	384 / 000	384 / 000	384 / 000	02	14.304.052
UDV-013	103 / 000	099 / 109	103 / 109	16	2.413.589
VMC1A12	125 / 131	117 / 121	117 / 125	07	22.589.377
VMC1B11	169 / 185	185 / 189	185 / 185	08	14.039.245
VMC1E12	224 / 234	240 / 254	224 / 240	14	7.136.672
VMC3A8	163 / 000	163 / 165	163 / 165	06	17.487.116
VMC3C9	249 / 251	251 / 258	251 / 251	08	17.399.458
VMC4f3.1	165 / 171	171 / 208	171 / 171	12	16.417.601
VMC5G8	298 / 318	314 / 322	314 / 318	15	14.895.321
VMC5H11	184 / 199	184 / 190	184 / 199	19	1.241.284
VMC7H3	122 / 134	132 / 000	122 / 132	04	4.719.044
VMC8A7	161 / 169	157 / 000	157 / 169	01	3.423.454
VMC8C2	147 / 000	147 / 000	147 / 000	02	17.627.087
VMC8E8	116 / 000	116 / 000	000 / 000	01	17.429.548
VMC8F10	209 / 235	199 / 207	207 / 209	03	3.324.131
VMC8G6	145 / 155	147 / 155	145 / 147	12	2.354.142
VRZAG21	189 / 195	201 / 205	189 / 201	04	13.794.845
VRZAG62	188 / 194	188 / 204	194 / 204	07	na
VRZAG67	122 / 150	134 / 148	122 / 148	10	5.006.496
VRZAG79	251 / 253	251 / 255	251 / 251	05	5.692.693
VRZAG83	189 / 000	195 / 201	189 / 195	04	20.654.770
VVIB01	291 / 000	291 / 000	291 / 000	02	2.161.587
VVIB23	287 / 313	287 / 313	287 / 287	02	4.807.391
VVIH54	177 / 181	163 / 165	163 / 177	13	3.434.661
VVIM01	181 / 000	181 / 000	181 / 000	13	6.609.298
VVIM10	368 / 376	354 / 366	366 / 376	18	10.439.542
VVIN16	145 / 149	149 / 155	149 / 155	18	26.361.444
VVIN33	272 / 282	288 / 000	282 / 288	05	11.721.184
VVIN62	358 / 000	356 / 362	356 / 358	13	1.387.838
VVIN73	264 / 266	266 / 000	264 / 266	17	5.636.281
VVIN78	158 / 000	158 / 160	158 / 160	10	10.476.790
VVIN85	354 / 360	354 / 356	354 / 360	10	6.040.628

Marker	Kunleany P_1	Irsai Oliver P_2	Zlata F_1	Chr.	Position
VVIP02	265 / 275	263 / 275	275 / 000	11	9.136.293
VVIP31	181 / 185	173 / 191	181 / 191	19	6.697.524
VVIP33	404 / 000	402 / 404	402 / 404	15	13.060.296
VVIP60	314 / 318	318 / 322	314 / 318	01	9.196.429
VVIP72	074 / 074	000 / 000	074 / 000	06	2.228.230
VVIQ52	078 / 082	076 / 082	078 / 082	09	21.558.104
VVIQ66	180 / 000	180 / 000	180 / 000	09	10.809.140
VVIV37	148 / 156	160 / 166	156 / 160	10	14.591.116
VVIV67	333 / 357	373 / 377	357 / 373	15	10.897.737
VVMD21	250 / 257	244 / 000	244 / 250	06	14.883.818
VVMD24	206 / 212	210 / 000	210 / 212	14	24.252.056
VVMD25	237 / 249	241 / 255	241 / 249	11	2.971.910
VVMD27	182 / 186	180 / 182	182 / 186	05	4.472.175
VVMD28	258 / 000	218 / 268	258 / 268	03	12.005.584
VVMD31	204 / 212	214 / 224	204 / 214	07	5.255.257
VVMD32	238 / 258	250 / 272	250 / 258	04	18.402.512
VVMD34	000 / 000	221 / 237	237 / 000	02	3.542.454
VVMD5	230 / 234	228 / 238	234 / 238	16	22.305.077
VVMD7	239 / 000	247 / 249	239 / 249	07	1.560.528
VVNTM1	168 / 000	168 / 000	168 / 000	02	14.261.177
VVNTM3	275 / 000	275 / 000	275 / 000	02	14.399.922
VVNTM6	147 / 000	147 / 000	147 / 000	02	14.442.196
VVS19	166 / 000	185 / 000	185 / 000	05	21.887.550
VVS2	129 / 133	135 / 155	133 / 155	11	3.909.894

Tabelle 44: Resistenzloci der Rebsorte `Zlata´. Verwendet wurden 20 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und der assoziierte Resistenzlocus (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). P_1 und P_2 repräsentieren die Parentaltypen und F_1 die Nachkommenschaft.

Marker	**Kunleany** P_1	**Irsai Oliver** P_2	**Zlata** F_1	**Chr.**	**Resistenzlocus**
9M3-3	000 / 000	000 / 000	000 / 000	15	*Rcg1*
GF02-31	246 / 259	246 / 259	259 / 259	02	*Sex*
GF09-46	422 / 000	394 / 422	394 / 422	09	*Rpv10*
GF09-48	348 / 000	348 / 000	348 / 000	09	*Rpv10*
GF14-28	150 / 160	166 / 180	150 / 166	14	*Rpv12*
GF15-28	338 / 361	375 / 379	361 / 375	15	*Rcg1 / Ren3*
GF15-30	442 / 000	418 / 466	466 / 000	15	*Rcg1*
GF15-41	257 / 259	259 / 000	259 / 000	15	*Ren3*
GF15-66	000 / 000	353 / 000	353 / 000	15	*Ren9*
GF18-06	385 / 393	381 / 391	381 / 385	18	*Rpv3*
GF18-08	382 / 384	384 / 392	384 / 384	18	*Rpv3*
Sc34_8	224 / 000	224 / 000	224 / 000	12	*Run1*
Sc35_2	244 / 254	248 / 250	248 / 254	12	*Run1*
UDV-015	182 / 000	174 / 000	174 / 182	15	*Rcg1*
UDV-340	178 / 000	000 / 000	178 / 000	14	*Rpv12*
UDV-343	159 / 191	185 / 213	159 / 185	14	*Rpv12*
UDV-380	103 / 000	097 / 103	103 / 000	14	*Rpv12*
UDV-360	207 / 209	201 / 000	201 / 207	14	*Rpv12*
VMC9h4.2	274 / 286	286 / 312	286 / 312	13	*Ren1*
sc36_7	193 / 197	191 / 000	191 / 197	14	*Rpv12*

Tabelle 45: Allelgrößen der Referenzsorten `Muscat A Petit Grains´ und `Cabernet Franc´. Verwendet wurden 60 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und die Position auf dem Chromosom (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017). Ein Teil der Allelgrößen der Referenzsorten wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. Erika Maul.

Marker	Muscat A Petit Grains	Cabernet Franc	Chr.	Position
APT3	268 / 466	268 / 466	02	na
GF02-01	274 / 286	274 / 274	02	4.554.038
GF02-03	287 / 293	262 / 274	02	5.788.718
GF02-55	000 / 000	214 / 214	02	14.110.164
GF02-62	384 / 384	384 / 386	02	14.304.052
UDV-013	099 / 103	105 / 105	16	2.413.589
VMC1A12	119 / 149	119 / 149	07	22.589.377
VMC1B11	185 / 189	185 / 189	08	14.039.245
VMC1E12	254 / 254	244 / 244	14	7.136.672
VMC3A8	165 / 169	193 / 193	06	17.487.116
VMC3C9	251 / 258	251 / 251	08	17.399.458
VMC4f3.1	165 / 206	171 / 177	12	16.417.601
VMC5G8	314 / 318	318 / 322	15	14.895.321
VMC5H11	184 / 201	199 / 201	19	1.241.284
VMC7H3	134 / 134	134 / 134	04	4.719.044
VMC8A7	161 / 165	161 / 161	01	3.423.454
VMC8C2	147 / 147	147 / 149	02	17.627.087
VMC8E8	126 / 126	122 / 122	01	17.429.548
VMC8F10	197 / 199	199 / 218	03	3.324.131
VMC8G6	135 / 161	157 / 169	12	2.354.142
VRZAG21	205 / 205	189 / 199	04	13.794.845
VRZAG62	186 / 196	194 / 204	07	na
VRZAG67	122 / 128	122 / 128	10	5.006.496
VRZAG79	251 / 255	247 / 259	05	5.692.693
VRZAG83	189 / 189	195 / 201	04	20.654.770
VVIB01	291 / 295	291 / 291	02	2.161.587
VVIB23	287 / 293	287 / 291	02	4.807.391
VVIH54	165 / 165	165 / 179	13	3.434.661
VVIM01	181 / 181	181 / 181	13	6.609.298
VVIM10	366 / 368	366 / 376	18	10.439.542
VVIN16	147 / 147	149 / 151	18	26.361.444
VVIN33	284 / 288	280 / 290	05	11.721.184

Marker	Muscat A Petit Grains	Cabernet Franc	Chr.	Position
VVIN62	362 / 362	362 / 362	13	1.387.838
VVIN73	264 / 266	266 / 270	17	5.636.281
VVIN78	158 / 160	158 / 160	10	10.476.790
VVIN85	356 / 356	354 / 354	10	6.040.628
VVIP02	269 / 275	269 / 275	11	9.136.293
VVIP31	181 / 185	187 / 187	19	6.697.524
VVIP33	402 / 404	394 / 402	15	13.060.296
VVIP60	318 / 318	314 / 324	01	9.196.429
VVIP72	074 / 074	074 / 087	06	2.228.230
VVIQ52	076 / 076	076 / 076	09	21.558.104
VVIQ66	180 / 180	180 / 180	09	10.809.140
VVIV37	160 / 162	150 / 160	10	14.591.116
VVIV67	365 / 376	373 / 373	15	10.897.737
VVMD21	250 / 267	249 / 259	06	14.883.818
VVMD24	210 / 215	206 / 206	14	24.252.056
VVMD25	241 / 249	239 / 255	11	2.971.910
VVMD27	180 / 195	182 / 190	05	4.472.175
VVMD28	246 / 268	228 / 236	03	12.005.584
VVMD31	212 / 216	206 / 216	07	5.255.257
VVMD32	264 / 272	240 / 258	04	18.402.512
VVMD34	237 / 237	237 / 237	02	3.542.454
VVMD5	230 / 238	228 / 242	16	22.305.077
VVMD7	233 / 249	239 / 263	07	1.560.528
VVNTM1	168 / 168	166 / 168	02	14.261.177
VVNTM3	275 / 275	275 / 295	02	14.399.922
VVNTM6	147 / 147	147 / 147	02	14.442.196
VVS19	166 / 185	161 / 161	05	21.887.550
VVS2	133 / 133	139 / 147	11	3.909.894

Tabelle 46: Resistenzloci der Referenzsorten `Muscat A Petit Grains´ und `Cabernet Franc´. Verwendet wurden 20 SSR-Marker. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Marker, die Genotypen, ihr verwandtschaftliches Verhältnis zu den Genotypen, das Chromosom des Locus und der assoziierte Resistenzlocus (bezogen auf das Referenzgenom *V. vinifera* 12x PN40024 V2, Jaillon *et al*., 2007; Canaguier *et al.,* 2017).

Marker	Muscat A Petit Grains	CabernetFranc	Chr.	Resistenzlocus
9M3-3	000 / 000	000 / 000	15	*Rcg1*
GF02-31	246 / 259	246 / 259	02	*Sex*
GF09-46	394 / 394	422 / 422	09	*Rpv10*
GF09-48	348 / 348	348 / 348	09	*Rpv10*
GF14-28	180 / 192	170 / 170	14	*Rpv12*
GF15-28	368 / 378	376 / 376	15	*Rcg1 / Ren3*
GF15-30	000 / 000	000 / 000	15	*Rcg1*
GF15-41	259 / 259	259 / 259	15	*Ren3*
GF15-66	000 / 000	353 / 353	15	*Ren9*
GF18-06	375 / 387	375 / 375	18	*Rpv3*
GF18-08	384 / 384	386 / 386	18	*Rpv3*
Sc34_8	228 / 228	224 / 226	12	*Run1*
Sc35_2	247 / 251	249 / 249	12	*Run1*
UDV-015	174 / 176	164 / 174	15	*Rcg1*
UDV-340	176 / 176	185 / 185	14	*Rpv12*
UDV-343	213 / 213	191 / 191	14	*Rpv12*
UDV-380	097 / 097	098 / 098	14	*Rpv12*
UDV-360	201 / 201	186 / 199	14	*Rpv12*
VMC9h4.2	263 / 263	275 / 281	13	*Ren1*
sc36_7	191 / 191	183 / 195	14	*Rpv12*

6.3 Datengrundlage zur Myzelberechnung

Tabelle 47: Original Pixelanzahl die von Myzel bewachsen ist. Diese Daten wurden mittels Fiji entsprechend 2.3.11 erhoben. Die Genotypen `Afus Ali´ und `Italia´ dienten als anfällige Referenz. Der Genotyp `Kunleany´ trägt den Resistenzlocus *Rpv12*, die Genotypen 65-153-18 und `Kunbarat´ tragen die Resistenzloci *Rpv12* und *Rcg1*. Die Genotypen Hozy01 und Hozy10 tragen den *Rpv12*-Locus homozygot. Hozy10 trägt ergänzend noch den Locus *Rpv3.1* homozygot. 2004-043-0021 trägt die Loci *Run1*, *Ren3*, *Ren9*, *Rpv1*, *Rpv3.1*. Der Resistenzlocus des Genotyps DEU098-2006-017 ist nicht bekannt.

	Afus Ali	Italia	Kunbarat	Kunleany	Hozy01	Hozy10	65-153-18	2004-043-0021	2014-099-0003	DEU098-2006-017
BL1 BS1 (1)	612682	2091931	1088485	485032	28817	18531	467158	297036	742090	162170
BL1 BS1 (2)	508784	2061427	1081000	470991	30939	34587	476717	239647	549503	204600
BL1 BS1 (3)	862676	2207842	507876	344915	39024	15460	592547	209966	721969	186045
BL1 BS1 (4)	590386	2006706	841502	496760	68909	29677	497794	290298	874293	90266
BL1 BS1 (5)	681690	2203054	823187	666765	36741	9742	565508	-	706160	71756
BL1 BS2 (1)	893547	1964557	910064	549039	49754	14031	803880	190335	72072	570962
BL1 BS2 (2)	922706	1866232	1101578	394286	27241	12226	415959	244393	92706	290304
BL1 BS2 (3)	2270305	1993597	1093466	492522	22202	14059	405838	196933	70279	583344
BL1 BS2 (4)	836625	2171153	1110001	208609	31665	25041	563883	266502	144204	243627
BL1 BS2 (5)	1924453	2175478	937464	360360	23172	15795	540921	163983	65194	307431
BL1 BS3 (1)	290869	1899649	971375	311859	8484	32069	726803	277968	493208	272086
BL1 BS3 (2)	1029040	2162473	1106512	446618	12007	15549	594300	397055	669711	110755
BL1 BS3 (3)	414982	2019558	1389210	185956	25715	29398	431308	208011	222527	216349
BL1 BS3 (4)	466149	2068149	1342267	377248	19346	18088	568957	279899	352677	109543
BL1 BS3 (5)	540083	1711251	474117	464522	81403	11562	615639	145092	642009	73234
BL2 BS1 (1)	2450858	2107646	1752860	1786895	75789	11780	1229551	401624	504968	503122
BL2 BS1 (2)	2177046	2250545	1450355	1791419	54423	7547	1282463	353829	497529	481107
BL2 BS1 (3)	2314946	1961926	1525402	1839214	78640	7813	799613	420046	708493	979880
BL2 BS1 (4)	2362432	2351356	1575002	1638504	60268	6187	1323398	287932	438437	730784

	Afus Ali	Italia	Kunbarat	Kunleany	Hozy01	Hozy10	65-153-18	2004-043-0021	2014-099-0003	DEU098-2006-017
BL2 BS1 (5)	2053205	2267751	1224876	1800903	61752	3412	1120280	257265	544311	496093
BL2 BS2 (1)	2178952	2432521	1136506	1894034	24217	6143	1108509	397769	489088	1035923
BL2 BS2 (2)	2065265	2171295	1415322	1778654	27937	11957	1251346	449205	488509	1053665
BL2 BS2 (3)	2078709	2301973	1135986	1634308	32775	7346	1074009	411604	465459	797841
BL2 BS2 (4)	2171540	2093404	1257379	1716121	54961	8204	1365865	386237	475799	852695
BL2 BS2 (5)	2352389	1958472	919805	1654937	55242	23930	1280968	541675	335287	1161800
BL2 BS3 (1)	1972673	2429794	1220928	1800023	55558	-	1091098	428071	716670	979654
BL2 BS3 (2)	1918521	2287333	1077278	1770347	20491	-	1039386	326683	350656	751444
BL2 BS3 (3)	2221716	2237025	1217026	1351385	44521	-	1268333	336570	292203	929633
BL2 BS3 (4)	2192706	2009260	1477674	1600956	68311	-	1449692	322364	580780	251822
BL2 BS3 (5)	-	1773780	1387840	1702601	88563	-	1282389	366351	554284	881020
BL3 BS1 (1)	2163012	1951486	852182	1160489	6839	6344	737331	318276	164996	463715
BL3 BS1 (2)	2143043	2408068	730939	1223385	13797	28419	662826	389501	280990	228471
BL3 BS1 (3)	1790199	1662390	787943	1316750	25308	37492	741178	390870	188173	335620
BL3 BS1 (4)	2001234	2153159	842773	1337315	22577	20621	722936	536409	199542	164871
BL3 BS1 (5)	2027015	1965752	881425	1103979	5959	25325	798866	537438	90158	312984
BL3 BS2 (1)	1981727	2342362	792155	1334072	7958	23360	770358	598791	353534	741132
BL3 BS2 (2)	1974531	2679258	692161	875590	17355	18282	646568	496235	279252	249254
BL3 BS2 (3)	1897767	2124814	585611	920364	35421	26465	710497	246188	299447	364707
BL3 BS2 (4)	2013915	2021168	772401	1311728	23765	25894	533193	376968	598041	463258
BL3 BS2 (5)	1787648	2106310	978740	965441	16123	25427	978933	322122	316934	490669
BL3 BS3 (1)	1848110	2194665	612343	1012878	14820	37729	797054	305529	470965	400845
BL3 BS3 (2)	1531282	1866640	633226	1539577	32327	34866	715606	818606	237735	443135
BL3 BS3 (3)	1852909	2136770	816423	1244630	49415	18006	682964	137950	555495	398359
BL3 BS3 (4)	1606906	1688418	997373	1086291	14584	38276	753413	294522	219145	379839
BL3 BS3 (5)	1688528	1991607	442940	1315748	26546	12294	773516	-	481118	425786

	Afus Ali	Italia	Kunbarat	Kunleany	Hozy01	Hozy10	65-153-18	2004-043-0021	2014-099-0003	DEU098-2006-017
Mittelwert	1628722	2100667	1021577	1105867	36037	19223	827986	345669	413258	472036
Standard-abweichung	660595	205129	307350	553081	21825	9959	297885	130706	209381	299636

Tabelle 48: Myzelberechnung in Prozent der analysierten Bildfläche. Diese Daten wurden mittels Fiji entsprechend 2.3.11 erhoben und mit der Gesamtpixelzahl 4915200 verrechnet. Die Genotypen `Afus Ali´ und `Italia´ dienten als anfällige Referenz. Der Genotyp `Kunleany´ trägt den Resistenzlocus *Rpv12*, die Genotypen 65-153-18 und `Kunbarat´ tragen die Resistenzloci *Rpv12* und *Rcg1*. Die Genotypen Hozy01 und Hozy10 tragen den *Rpv12*-Locus homozygot. Hozy10 trägt ergänzend noch den Locus *Rpv3.1* homozygot. 2004-043-0021 trägt die Loci *Run1*, *Ren3*, *Ren9*, *Rpv1*, *Rpv3.1*. Der Resistenzlocus des Genotyps DEU098-2006-017 ist nicht bekannt.

	Afus Ali	Italia	Kunbarat	Kunleany	Hozy01	Hozy10	65-153-18	2004-043-0021	2014-099-0003	DEU098-2006-017
BL1 BS1 (1)	12,5	42,6	22,1	9,9	0,6	0,4	9,5	6,0	15,1	3,3
BL1 BS1 (2)	10,4	41,9	22,0	9,6	0,6	0,7	9,7	4,9	11,2	4,2
BL1 BS1 (3)	17,6	44,9	10,3	7,0	0,8	0,3	12,1	4,3	14,7	3,8
BL1 BS1 (4)	12,0	40,8	17,1	10,1	1,4	0,6	10,1	5,9	17,8	1,8
BL1 BS1 (5)	13,9	44,8	16,7	13,6	0,7	0,2	11,5	1,9	14,4	1,5
BL1 BS2 (1)	18,2	40,0	18,5	11,2	1,0	0,3	16,4	3,9	1,5	11,6
BL1 BS2 (2)	18,8	38,0	22,4	8,0	0,6	0,2	8,5	5,0	1,9	5,9
BL1 BS2 (3)	46,2	40,6	22,2	10,0	0,5	0,3	8,3	4,0	1,4	11,9
BL1 BS2 (4)	17,0	44,2	22,6	4,2	0,6	0,5	11,5	5,4	2,9	5,0
BL1 BS2 (5)	39,2	44,3	19,1	7,3	0,5	0,3	11,0	3,3	1,3	6,3
BL1 BS3 (1)	5,9	38,6	19,8	6,3	0,2	0,7	14,8	5,7	10,0	5,5
BL1 BS3 (2)	20,9	44,0	22,5	9,1	0,2	0,3	12,1	8,1	13,6	2,3
BL1 BS3 (3)	8,4	41,1	28,3	3,8	0,5	0,6	8,8	4,2	4,5	4,4
BL1 BS3 (4)	9,5	42,1	27,3	7,7	0,4	0,4	11,6	5,7	7,2	2,2
BL1 BS3 (5)	11,0	34,8	9,6	9,5	1,7	0,2	12,5	3,0	13,1	1,5
BL2 BS1 (1)	49,9	42,9	35,7	36,4	1,5	0,2	25,0	8,2	10,3	10,2
BL2 BS1 (2)	44,3	45,8	29,5	36,4	1,1	0,2	26,1	7,2	10,1	9,8
BL2 BS1 (3)	47,1	39,9	31,0	37,4	1,6	0,2	16,3	8,5	14,4	19,9
BL2 BS1 (4)	48,1	47,8	32,0	33,3	1,2	0,1	26,9	5,9	8,9	14,9
BL2 BS1 (5)	41,8	46,1	24,9	36,6	1,3	0,1	22,8	5,2	11,1	10,1
BL2 BS2 (1)	44,3	49,5	23,1	38,5	0,5	0,1	22,6	8,1	10,0	21,1
BL2 BS2 (2)	42,0	44,2	28,8	36,2	0,6	0,2	25,5	9,1	9,9	21,4

	Afus Ali	Italia	Kunbarat	Kunleany	Hozy01	Hozy10	65-153-18	2004-043-0021	2014-099-0003	DEU098-2006-017
BL2 BS2 (3)	42,3	46,8	23,1	33,3	0,7	0,1	21,9	8,4	9,5	16,2
BL2 BS2 (4)	44,2	42,6	25,6	34,9	1,1	0,2	27,8	7,9	9,7	17,3
BL2 BS2 (5)	47,9	39,8	18,7	33,7	1,1	0,5	26,1	11,0	6,8	23,6
BL2 BS3 (1)	40,1	49,4	24,8	36,6	1,1	-	22,2	8,7	14,6	19,9
BL2 BS3 (2)	39,0	46,5	21,9	36,0	0,4	-	21,1	6,6	7,1	15,3
BL2 BS3 (3)	45,2	45,5	24,8	27,5	0,9	-	25,8	6,8	5,9	18,9
BL2 BS3 (4)	44,6	40,9	30,1	32,6	1,4	-	29,5	6,6	11,8	5,1
BL2 BS3 (5)	-	36,1	28,2	34,6	1,8	-	26,1	7,5	11,3	17,9
BL3 BS1 (1)	44,0	39,7	17,3	23,6	0,1	0,1	15,0	6,5	3,4	9,4
BL3 BS1 (2)	43,6	49,0	14,9	24,9	0,3	0,6	13,5	7,9	5,7	4,6
BL3 BS1 (3)	36,4	33,8	16,0	26,8	0,5	0,8	15,1	8,0	3,8	6,8
BL3 BS1 (4)	40,7	43,8	17,1	27,2	0,5	0,4	14,7	10,9	4,1	3,4
BL3 BS1 (5)	41,2	40,0	17,9	22,5	0,1	0,5	16,3	10,9	1,8	6,4
BL3 BS2 (1)	40,3	47,7	16,1	27,1	0,2	0,5	15,7	12,2	7,2	15,1
BL3 BS2 (2)	40,2	54,5	14,1	17,8	0,4	0,4	13,2	10,1	5,7	5,1
BL3 BS2 (3)	38,6	43,2	11,9	18,7	0,7	0,5	14,5	5,0	6,1	7,4
BL3 BS2 (4)	41,0	41,1	15,7	26,7	0,5	0,5	10,8	7,7	12,2	9,4
BL3 BS2 (5)	36,4	42,9	19,9	19,6	0,3	0,5	19,9	6,6	6,4	10,0
BL3 BS3 (1)	37,6	44,7	12,5	20,6	0,3	0,8	16,2	6,2	9,6	8,2
BL3 BS3 (2)	31,2	38,0	12,9	31,3	0,7	0,7	14,6	16,7	4,8	9,0
BL3 BS3 (3)	37,7	43,5	16,6	25,3	1,0	0,4	13,9	2,8	11,3	8,1
BL3 BS3 (4)	32,7	34,4	20,3	22,1	0,3	0,8	15,3	6,0	4,5	7,7
BL3 BS3 (5)	34,4	40,5	9,0	26,8	0,5	0,3	15,7	7,4	9,8	8,7
Mittelwert	33,1	42,7	20,8	22,5	0,7	0,4	16,8	6,9	8,4	9,7
Standard-abweichung	13,3	4,2	6,3	11,3	0,4	0,2	6,1	2,7	4,3	6,3

7 Danksagung

Zur Entstehung dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, welchen ich meinen Dank aussprechen möchte:

Prof. Dr. Eva Zyprian danke ich für die Betreuung, Unterstützung und die Erstkorrektur der Doktorarbeit.

Prof. Dr. Reinhard Töpfer danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Doktorarbeit am Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof in Siebeldingen.

Prof. Dr. Peter Nick danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Dr. Bruno Hüttel und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Durchführung der SMRT-DNA-Sequenzierung des Genotyps 2014-099-0003.

Prof. Dr. Bernd Weisshaar, Dr. Daniela Holtgräwe, Dipl. Ing. Prisca Viehöfer und vor allem M. Sc. Bianca Frommer danke ich für eine spannende und zielführende Kooperation im Rahmen des Trio Binnings des Genotyps 2014-099-0003.

Evi Bieler und Dr. Markus Dürrenberger danke ich für die Durchführung von Raster-elektronenmikroskopischer Aufnahmen.

Dr. Erika Maul, Dr. Oliver Trapp und Dr. Ludger Hausmann danke ich für ihre Unterstützung in allen Fragen rund um die Rebe.

Dr. Günther Buchholz danke ich für die Unterstützung in mikroskopischen Fragen und das Teilen seiner umfassenden Kenntnisse zu *Plasmopara viticola*.

Dr. Franco Röckl danke ich für den Hinweis zum Stammbaum der Rebsorten `Kunbarat´ und `Petra´.

Claudia Welsch danke ich für alle Bestellungen, ihre Unterstützung in schwierigen Zeiten und ihre Freundschaft.

Tino Wahl, Gunther Schneider, Dorothea Mack, Carmen Heidenreich-Zitt und Thomas Gramm danke ich für die Aufzucht, Pflege und den Erhalt meiner Reben.

Abdulkhalek Abdaan, Felicitas Bartsch, Lucie Gebauer, Tim Höschele, Elisa Kalvelage, Nagarjun Malagol, Anna Markheiser, Gertrud Michl, Sissy Schatt und Susanne Schramm danke ich für ihre Unterstützung und Freundschaft.

Bastian Heß, Felicitas Bartsch, Lucie Gebauer und Doreen Gabriel danke ich außerdem für die Unterstützung bei mathematischen Überlegungen und im Umgang mit der Software R.

Thomas Proksch danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung von Makros für Excel und Fiji, sowie Korrekturlesen und seinen emotionalen Beistand.

Vor allem möchte ich aber meiner Familie danken.

Meiner Mutter, Christine Müllner, danke ich dafür, dass sie stets für einen doppelten Boden gesorgt hat und wenn nötig Unmögliches möglich machte.

Meinen Schwestern Dr. Julia und Dr. Anna Müllner, für ihre Unterstützung, ihre Kritik, wissenschaftliche Auseinandersetzungen und den immerwährenden Zusammenhalt.

Besonders meinem Vater, Dr. Stefan Müllner, möchte ich danken für seine ewige Unterstützung, seine Geduld und sein Vertrauen in meine Fähigkeiten. Dafür, dass er mich in meinen Vorhaben stets bestärkt und meine Ausbildung gefördert hat.

JKI
Julius Kühn-Institut
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen