

Dipl.-Biol. Florian Schwander
Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof

Identifikation des
Mehltauresistenzlocus *Rpv10*
für die Rebenzüchtung



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt:

Dipl.-Biol. Florian Schwander
Julius Kühn-Institut
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof
76833 Siebeldingen

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind oder herausragende eigenständige Arbeiten aus den Forschungsgebieten des JKI darstellen.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot www.jki.bund.de Bereich Veröffentlichungen.

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

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

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

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

ISBN 978-3-930037-78-0

Herausgeber / Editor

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

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen sowie der genannten Universität, 2012.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

Identifikation des
Mehltauresistenzlocus *Rpv10*
für die Rebenzüchtung

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

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich
genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Biol. Florian Schwander

aus

Freiburg im Breisgau

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: apl. Prof. Dr. Eva M. Zyprian

Korreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2011



Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte am Julius-Kühn-Institut (JKI), Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof und wurde durch die finanzielle Unterstützung vom Forschungsring des Deutschen Weinbaus (FDW) bei der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG) über das Projekt: „Entwicklung von molekularen Markern für Resistenzeigenschaften aus der asiatischen Wildrebe *Vitis amurensis* gegenüber dem Falschen Mehltau *Plasmopara viticola*“ ermöglicht.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in der Fachzeitschrift *Theoretical and Applied Genetics* (Volume 124, Number 1, 163-176) unter dem Titel: *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine ([DOI: 10.1007/s00122-011-1695-4](https://doi.org/10.1007/s00122-011-1695-4)) veröffentlicht. Die aus dieser Veröffentlichung verwendeten Abbildungen wurden aus Gründen des *Copyrights* durch Zitierung gekennzeichnet.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	2
1 EINLEITUNG	3
1.1 Resistenzzüchtung bei Reben	4
1.1.1 Genetische Ressourcen für Resistenz	4
1.1.2 Markergestützte Selektion	5
1.2 Falscher Mehltau der Rebe	7
1.2.1 Infektionszyklus und –verlauf	8
1.2.2 Bekämpfungsstrategien	10
1.3 Pflanzliche Resistenzen	10
1.3.1 Präformierte Resistenz	11
1.3.2 Pathogenerkennung	12
1.3.3 Induzierte Resistenzen	13
1.4 Genetische Kartierung	16
1.4.1 Erstellen der genetischen Karte	16
1.4.2 QTL-Analyse	17
1.5 Zielsetzung	18

2	MATERIAL & METHODEN	20
2.1	Material	20
2.1.1	Pflanzenmaterial	21
2.1.2	<i>Plasmopara viticola</i> -Sporenmateri al	21
2.1.3	Genetische Ressourcen	22
2.2	Methoden	22
2.2.1	Ermittlung der <i>Plasmopara</i> -Resistenz durch Blattscheibentests	22
2.2.2	Stilben-Analyse mittels HPLC	23
2.2.3	Kallose-Nachweis	24
2.2.4	DNA-Extraktion	24
2.2.5	SSR-Marker	24
2.2.6	Polymerasekettenreaktion und Fragmentlängenanalyse	27
2.2.7	Erstellen der genetischen Karten	27
2.2.8	QTL-Analysen	28
2.2.9	Statistische Tests auf Normalverteilung	28
2.2.10	Abgleich mit den Genomsequenzen	28
3	ERGEBNISSE	29
3.1	Phänotypisierung der <i>Plasmopara</i>-Resistenz	29
3.2	Stilben-Analyse	33
3.3	Kallose-Nachweis	34
3.4	Genetische Kartierung	34
3.5	QTL-Analysen	39
3.6	Effekt der Pyramidisierung von Resistenzen	43
3.7	Abgleich des <i>Rpv10</i>-Locus mit dem Referenzgenom	45
3.8	Stammbaum der Kreuzungspopulation	47
3.9	Untersuchung ausgewählter Sorten auf den <i>Rpv10</i>-Locus	51
3.10	Untersuchung genetischer Ressourcen	52

4	DISKUSSION	58
4.1	Phänotypische Evaluierung der <i>Plasmopara</i> -Resistenz	58
4.2	Stilben-Analyse und Kallose-Nachweis	59
4.3	Genetische Karte und QTL-Analysen	60
4.4	Abgleich mit den veröffentlichten Genomsequenzen.....	64
4.5	Abstammungsanalysen	66
4.6	Genetische Identifizierung von <i>Rpv10</i> ⁺ -Ressourcen.....	67
4.7	Schlussfolgerungen.....	69
	LITERATURVERZEICHNIS	IX
	ANHANG.....	XX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schadbild des Falschen Mehltaus. a) Infizierte Blätter mit „Ölflecken“ und ersten Nekrosen. b) „Ölflecken“ auf der Blattoberseite und durch die Sporangienträger gebildeter mehrlartiger Belag auf der Blattunterseite. c) Nach dem Befall der jungen Gescheine entstandene „Lederbeeren“.	7
Abbildung 2: Schematischer Infektionszyklus von <i>Plasmopara viticola</i> . Der äußere (rote) Zyklus stellt die sexuelle Vermehrung dar, während der innere (grüne) Zyklus die asexuelle Vermehrung während der Vegetationsperiode zeigt (Quelle: N. Schöppe, Staatliches Weinbauinstitut Freiburg).	9
Abbildung 3: Trauben der beiden Kreuzungseltern	19
Abbildung 4: Beispiele für infizierte Blattscheiben der Boniturnoten 1, 5 und 9 (von links nach rechts; 2,5-fach vergrößerte Darstellung).	23
Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung der <i>Plasmopara viticola</i> Resistenzklassen (9: keine Sporangienträger, 7: eins bis fünf, 5: sechs bis zwanzig, 3: mehr als zwanzig Sporangienträger, 1: dichter Sporangienträgerteppich) in der Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x ‘Solaris’. Die Daten basieren auf dem Mittelwert aus vier unabhängigen Bonituren mit je vier Blattscheiben während der Vegetationsperioden 2009 und 2010 an 265 Individuen. Die Pfeile geben die Resistenzbewertungen der Kreuzungseltern sowie der anfälligen Vergleichssorte ‘Müller-Thurgau’ an (Schwander <i>et al.</i> 2011).	29
Abbildung 6: Graphische Überprüfung des phänotypischen Datensatzes auf Normalverteilung mit NQ- und Box-Plot. Beim NQ-Plot sind die erhobenen Daten gegen die erwarteten Daten einer Normalverteilung aufgetragen. Für einen normalverteilten Datensatz ist dabei ein linearer Verlauf zu erwarten. Der Box-Plot zeigt, dass eine symmetrische Verteilung im Datensatz vorliegt.	30
Abbildung 7: Benetzbarkeit der Blattunterseite (Freilandmaterial) von Gf.Ga-52-42 und ‘Solaris’. Bei Gf.Ga-52-42 kommt es zu einer fast vollständigen Benetzung (links oben), wodurch sich das mit Fluorescein versetzte Wasser nicht vollständig entfernen lässt (links unten). Auf ‘Solaris’ verhindert die dichte hydrophobe Behaarung ein Benetzung der unteren Blattoberfläche (rechts oben). Dies ermöglicht ein fast vollständiges Entfernen des Tropfen (rechts unten). Größenbalken entspricht 2 mm.	32
Abbildung 8: Integrierte genetische Karte der Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x ‘Solaris’ mit 19 SSR-Markern auf den 19 Kopplungsgruppen der Rebe. Die Population umfasst 265 Individuen. Markerabstände werden in centi Morgan (cM) angegeben. An die Markernamen angehängt sind die kodierten Fragmentlängen (in bp) bei Markern, welche nur in einem Elternteil heterozygot sind. Die drei Resistenzloci sind mit schwarzem Balken markiert.	36

Abbildung 9: Entwicklung der Kartierung des <i>Rpv10</i> -Locus von der Identifikation auf der LG 09 (a) über mehrere Zwischenstufen (b, c) bis zur Feinkartierung (d). Dargestellt sind die jeweiligen Versionen der Kopplungsgruppe, die 1-LOD- und 2-LOD-Konfidenzintervalle sowie der graphische Verlauf der Interval Mapping (IM)- (grün) und Multiple QTL Mapping (MQM)-Analyseergebnisse (rot).....	38
Abbildung 10: Quantitative Faktoren der Merkmalsausprägung (LOD) der <i>P. viticola</i> -Resistenz auf LG 09 der integrierten Karte. Markerabstände in centi Morgan (cM). Interval Mapping (IM, grün, Quadrate) und Multiple QTL Mapping (MQM, rot, Kreise) mit Angabe der 1-LOD- (Box) und 2-LOD- (Linie) Konfidenzintervalle. Die Kopplungsgruppen (LG)-spezifische Signifikanzschwelle von 2,9 wird durch die gepunktete Linie gekennzeichnet.....	40
Abbildung 11: Quantitative Faktoren der Merkmalsausprägung (LOD) der <i>P. viticola</i> Resistenz auf LG 18 der integrierten Karte. Markerabstände in cM. IM (grün, Quadrate) und MQM (rot, Kreise) mit Angabe der 1-LOD- (Box) und 2-LOD- (Linie) Konfidenzintervalle. Die Kopplungsgruppen (LG)-spezifische Signifikanzschwelle von 2,7 wird durch die gepunktete Linie gekennzeichnet.	41
Abbildung 12: Quantitative Faktoren der Merkmalsausprägung (LOD) der <i>P. viticola</i> Resistenz auf LG 05 der integrierten Karte. Markerabstände in cM. IM (grün, Quadrate) und MQM (rot, Kreise) mit Angabe der 1-LOD- (Box) und 2-LOD- (Linie) Konfidenzintervalle. Die LG Kopplungsgruppen (LG)-spezifische Signifikanzschwelle von 2,6 wird durch die gepunktete Linie gekennzeichnet.	42
Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der Resistenzklassen bei Abwesenheit (-) oder Vorhandensein (+) der resistenzkorrelierten Allellängen der Marker GF09-46 auf LG 09 und UDV-737 auf LG 18. Mittelwert und Standardabweichung der Gruppen sind in Klammern angegeben (Schwander <i>et al.</i> 2011).....	44
Abbildung 14: Darstellung der Resistenzausprägung im Box-Plot bei Abwesenheit (-) oder Vorhandensein (+) der resistenzkorrelierenden Allellängen der Marker GF09-46 auf LG 09 und UDV-737 auf LG 18. Einzelne Datenpunkte außerhalb des 1,5-fachen Vertrauensbereiches der „Whisker“ sind durch Kreise gekennzeichnet.....	45
Abbildung 15: a) Physikalische Karte der Kopplungsgruppe 09 des PN40024-Referenzgenoms (nur ausgewählte Marker), b) die erweiterte QTL-Region mit NBS-LRR-, „Clustern“ und c) die mit Rpv10 korrespondierende Region auf der PN40024-Sequenz mit den vorhergesagten Proteinen zwischen den flankierenden SSR-Markern. Die Genoscope-Annotationen besitzen die Kennnummern GSVIVT010170**001 (**=Ziffern in Klammern).....	46

- Abbildung 16: Stammbaum der bearbeiteten F1-Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x ‘Solaris’. Durchgezogene Linien kennzeichnen durch SSR-Markerdaten bestätigte Beziehungen zwischen den getesteten Sorten (durchgezogen umrandete Kästen). Gestrichelte Linien und Kästen entsprechen den Angaben im “Vitis International Variety Catalogue” (<http://www.vivc.de>; Stand: Okt. 2011). Hellgrau hinterlegte Sorten besitzen den *Rpv3*-Resistenzlocus, während Akzessionen die *Rpv10* tragen, durch einen dunkelgrauen Hintergrund gekennzeichnet sind (Schwander *et al.* 2011). 48
- Abbildung 17: Abstammungsoptionen der Sorte ‘Solaris’. a) Durch die Markeranalyse ermittelter, b) gegenwärtig angegebener (Staatliches Weinbauinstitut Freiburg 2010) und c) ursprünglich beschriebener (Becker 1981) Stammbaum von ‘Solaris’. Durchgezogene Linien kennzeichnen durch Markerdaten bestätigte Verbindungen zwischen den getesteten Sorten (in durchgezogen umrandeten Kästen). Sorten in gestrichelten Kästen und gestrichelte Verbindungen kennzeichnen Abstammungen nach dem „Vitis International Variety Catalogue” (<http://www.vivc.de>; Stand: Okt. 2011). Dunkelgrauer Hintergrund kennzeichnet die Sorten, welche den *Rpv10*-Locus aufweisen. Ob ‘Saperavi Severnyi’ den *Rpv10*-Locus besitzt ist unbekannt (Schwander *et al.* 2011). 49
- Abbildung 18: Beispielhafte SSR-Marker-Allellängen, die ‘Zarya Severa’ als Vorfahre von ‘Solaris’ ausschließen (a, b) und die Abstammung von ‘Severnyi’ (a, b) und ‘Muscat Ottonel’ (c) unterstützen. Die beobachteten Fragmentlängen (bp) für beide Allele sind unter dem jeweiligen Sortennamen angegeben. a) ‘Solaris’ hat das Allel mit der 120 bp-Fragmentlänge von ‘Merzling’ geerbt, welcher durch alle verwendeten Marker als mütterliches Elternteil von ‘Solaris’ bestätigt wurde. Geisenheim 6493 steht für die Pollenmischung einer Kreuzungspopulation, weshalb keine DNA für diesen Genotyp verfügbar ist. Deshalb muss das 102 bp lange Fragment von einem der Großeltern stammen. In diesem Fall findet sich die entsprechende Fragmentlänge in ‘Severnyi’, wobei das Fehlen dieses Allels in ‘Zarya Severa’ diese Sorte als ‘Solaris’-Vorfahre ausschließt. b) Identische Situation wie in a) mit einem Marker im *Rpv10*-Locus. c) Beispiel für einen Marker, der ‘Muscat Ottonel’ als Großelternanteil von ‘Solaris’ bestätigt. ‘Saperavi Severnyi’ lässt sich durch die Beobachtung, dass sich alle Allele der 58 Marker auf ‘Severnyi’ oder ‘Muscat Ottonel’ zurückführen lassen, ebenfalls als Großelternanteil ausschließen. Andernfalls müsste man bei bis zu ¼ der Allele (im Fall ausschließlich heterozygoter Marker) die aus ‘Saperavi’ stammenden Allele in ‘Solaris’ beobachten können (Schwander *et al.* 2011)..... 50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Landwirtschaftliche Anbauflächen und Fungizidmengen der Hauptkulturen in der Europäischen Union. Angabe der Mittelwerte von 5 Jahren (1999-2003). Quelle: Eurostat (2007)	3
Tabelle 2 Taxonomische Einordnung von <i>Plasmopara viticola</i> nach http://www.speciesfungorum.org/ .	8
Tabelle 3: Für die Feinkartierung entwickelte und kartierte SSR-Marker.	26
Tabelle 4: Mögliche Segregationsmuster und Genotypen in einer Kreuzungspopulation	27
Tabelle 5: Tests der phänotypischen Resistenzdaten auf Normalverteilung.	31
Tabelle 6: Korrelationskoeffizienten zwischen dem <i>Plasmopara</i> -Resistenzniveau und den analysierten Stilbenen.	33
Tabelle 7: Hauptmerkmale der Kopplungsgruppen (LGs, „linkage groups“) in der integrierten Karte, der mütterlichen Gf.Ga-52-42-Karte sowie der väterlichen Karte von ‘Solaris’.	35
Tabelle 8: Identifizierte QTL in der Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x ‘Solaris’.	43
Tabelle 9: Untersuchung ausgewählter Sorten mit 12 den <i>Rpv10</i> -Locus flankierenden Markern. Die resistenzkorrelierenden Fragmentlängen sind grau hinterlegt.	51
Tabelle 10: Genetische Überprüfung von Genotypen mit Amurensis-Abstammung auf das Auftreten des <i>Rpv10</i> -Locus. Abstammungen nach den Angaben im VIVC (http://www.vivc.de ; Stand: Jun. 2011). Das Vorhandensein der resistenzkorrelierenden Allellänge (Zeile 3) wurde durch ein „+“, das Fehlen durch ein „-“ gekennzeichnet. In der letzten Spalte ist das Ergebnis mit <i>Rpv10</i> ⁺ oder <i>Rpv10</i> ⁻ zusammengefasst.	54
Tabelle 11: Identifizierte Genotypen mit dem <i>Rpv10</i> -Locus. Anordnung in den Spalten anhand der Generationen nach der Introgression von <i>V. amurensis</i> . Die Anordnung in den Zeilen erfolgte anhand der Abstammung. Kursive Sorten in Klammern wurden nicht getestet, sondern anhand der im VIVC vorgegebenen Abstammung als Resistenzüberträger aufgeführt.	57

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosinriphosphat
Avr	Avirulenz
BLAST	Algorithmus zum Abgleich von Sequenzen, engl.: „basic local alignment search tool“
CC-NBS-LRR	NBS-LRR mit N-terminaler „coiled-coil“-Domäne
cM	Centi Morgan, Maßeinheit für die genetische Distanz aus der Rekombinationsfrequenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl.: „deoxyribonucleic acid“
ERF	Ethylen-sensitiver Transkriptionsfaktor, engl.: „ethylene-responsive transcription factor“
GBP	Engl.: „glucanohydrolase binding proteins“
Gf / GF	Geilweilerhof (im Zuchtstammmamen und bei neuen SSR-Markern verwendet)
GTP	Guanosinriphosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl.: „high performance liquid chromatography“
HR	Hypersensitive Reaktion
<i>HSR1</i>	Engl.: „hypersensitive response factor 1“
IM	Engl.: „interval mapping“
JA	Jasmonsäure
kb	Kilobasen (10 ³ Basen)
LG	Kopplungsgruppe, engl.: „linkage group“
LOD	Wahrscheinlichkeitsabschätzung, engl.: „logarithm of the odds“
LRR	Leucin-reichen Wiederholungssequenzen, engl.: „leucine-rich-repeat“
MAP	Mitogen-aktiviertes-Protein
MAS	Markergestützte Selektion, engl.: „marker assisted selection“
MQM	Engl.: „Multiple QTL Mapping“
NBS-LRR	Rezeptorprotein, engl.: „nucleotide-binding site-leucine-rich repeat“
NO	Stickstoffmonoxid
NPR1	Engl.: „nonexpressor of pathogenesis-related genes 1“
OIV	International Organisation of Vine and Wine (http://www.oiv.int)
PAMP	Pathogen-assoziierte Moleküle, engl.: „pathogen-associated molecular pattern“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl.: „polymerase chain reaction“
PEN1	Engl.: „penetration 1“
PDF2	Engl.: „protodermal factor 2“
PN40024	homozygoter Inzuchtstamm von ‘Pinot Noir’, zur Genomsequenzierung verwendet
PR-Protein/Gen	Pathogen-induziertes Protein/Gen, engl.: „pathogenesis related protein/gene“
PTI	PAMP-getriggerte Immunantwort
QTL	Region eines quantitativen Merkmals, engl.: „quantitative trait locus“
RGA	Resistenzgenalog
R-Gen	Resistenz-Gen
RLK	Engl.: „receptor like kinases“
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, eng.: „reactive oxygen species“
<i>Rpv</i>	Resistenz-Locus gegen <i>Plasmopara viticola</i>
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SA	Salicylsäure, engl.: „salicylic acid“
SAR	Systemische Resistenz, engl.: „systemic aquired resistance“
SSR	Engl.: „simple sequence repeats“ oder Mikrosatelliten (kurze, repetitive Basenabfolgen)
TIR-NBS-LRR	NBS-LRR mit N-terminaler „toll/interleukine-1“-Domäne
VHS	Vps27p, Hrs und STAM Domäne (am Membrantransport beteiligte Proteine)
Vir	Virulenz
VIVC	Rebendatenbank „Vitis International Variety Catalogue“ (http://www.vivc.de)
<i>VRP1</i>	Vitis Resistenz gegen <i>Plasmopara</i> 1
<i>WRKY</i>	Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren mit typischem WRKYGQK-Motiv

Zusammenfassung

Ein neuer Resistenzlocus (*Rpv10*) gegen den Erreger des Falschen Mehltaus an der Rebe (*Plasmopara viticola*) konnte für die gezielte Nutzung in der Rebenzüchtung erschlossen werden. Die Untersuchungen erfolgten an einer Kreuzungspopulation zwischen dem Zuchtstamm Gf.Ga-52-42 und der Sorte 'Solaris' mit 265 F1-Individuen. Über SSR-Markeranalysen wurde eine genetische Karte der Kreuzungspopulation erstellt. Die Varianz der *Plasmopara*-Resistenz innerhalb der Population wurde durch die Verwendung des Blattscheibentests ermittelt. In den QTL-Analysen ergaben sich bei der Verrechnung der phänotypischen Resistenzdaten mit der genetischen Karte zwei starke QTLs auf den Kopplungsgruppen (LGs) 09 und 18. Der QTL auf LG 09 wurde von 'Solaris' in die Kreuzungspopulation eingebracht und erklärt bis zu 50 % der phänotypischen Varianz. Dieser neue, als *Rpv10* benannte Resistenzlocus stammt ursprünglich aus der asiatischen Wildart *Vitis amurensis*. Durch die Neuentwicklung Locus-spezifischer SSR-Marker anhand der Referenzgenomsequenz erfolgte eine Feinkartierung des *Rpv10*-Locus. Der resultierende QTL-Locus weist ein Konfidenzintervall (1-LOD) von nur noch 0,5 cM in der MQM-Analyse auf. Der korrespondierende Bereich zwischen den QTL flankierenden Markern entspricht 79 kb auf der 12x PN40024-Referenzgenomsequenz. In dieser Region sind ein RGA mit NBS-LRR-Motiv, ein Ethylen-sensitiver Transkriptionsfaktor, ein Protein mit Ankyrin-Domäne sowie eine mutmaßliche Ribonuclease als potentielle Kandidatengene annotiert. Bei dem zweiten starken QTL auf der LG 18 handelt es sich um den bei 'Regent' erstmals beschriebenen *Rpv3*-Locus. Die Genotypen der Kreuzungspopulation, welche sowohl den *Rpv3* als auch den *Rpv10* Locus aufweisen, zeigen eine signifikant erhöhte Resistenzausprägung. Dies weist auf einen additiven Effekt durch die Pyramidisierung der beiden Resistenzloci hin. Um den *Rpv10*-Locus in weiteren genetischen Ressourcen zu identifizieren wurden 94 Sorten und Zuchtstämme mit *V. amurensis* im Stammbaum mit Locus-spezifischen Markern getestet. Dabei konnten 22 Sorten als Resistenzträger ermittelt werden, die in der Resistenzzüchtung als *Rpv10*-Donor eingesetzt werden könnten. Bei dieser Untersuchung zeigte sich auch, welche SSR-Marker sich am besten für die Verwendung in der markergestützten Selektion (MAS) eignen. Die molekularen Marker zeigten zudem, dass 'Severnyi' und nicht wie irrtümlich in der Literatur angenommen 'Zarya Severa' ein Großelternanteil von 'Solaris' ist, über den die Resistenz von *V. amurensis* eingebracht wurde.

Abstract

Rpv10, a new locus originating from the Asian wild species *Vitis amurensis* mediates resistance against downy mildew on grapes caused by *Plasmopara viticola*. This locus was newly identified using a population derived from a cross between grapevine breeding strain Gf.Ga-52-42 and cultivar ‘Solaris’ consisting of 265 F1-individuals. A genetic map of the cross-population was constructed using SSR-Markers and all individuals were screened for downy mildew resistance. Quantitative trait locus (QTL) analysis revealed two major QTL on linkage groups (LGs) 09 and 18. ‘Solaris’ inherited the resistance related locus on LG 09 explaining up to 50 % of the phenotypic variation in the population. This locus, named *Rpv10*, was further restricted by adding newly developed locus-specific SSR markers. A minimum one-LOD confidence interval of 0.5 cM was achieved in MQM analyses. The region within the flanking markers spans a distance of 1.6 cM corresponding to 79 kb in the 12x reference genome sequence of PN40024. One resistance gene analogue (RGA) of the NBS-LRR type, an ethylene-responsive transcription factor, an ankyrin-like protein and a probable ribonuclease are annotated within this range to be considered as putative candidates for mediating resistance. The major QTL on LG 18 transmitted by Gf.Ga-52-42 is identical to the *Rpv3* locus known from ‘Regent’ and ‘Bianca’. The F1 sub-population which contains the *Rpv3* as well as the *Rpv10* locus showed a significantly higher degree of resistance indicating additive effects by pyramiding of resistance loci. Furthermore, the marker data revealed ‘Severnyi’ as the descent responsible for introgression of the *V. amurensis* resistance in ‘Solaris’ contradicting the previously assumed derivation.

Genetic resources having a *V. amurensis* background were screened for the *Rpv10* genotype. Twenty-two out of ninety-four varieties were identified providing the *Rpv10* locus which can potentially be used for implementing the locus into the further breeding progress. This screening also revealed the most suitable SSR-markers for a reliable identification of the *Rpv10* locus in marker assisted breeding (MAS).

1 Einleitung

Die Hauptpathogene der Kulturform der europäischen Rebe (*Vitis vinifera* L.) und damit des Weinbaus wurden Mitte des 19. Jahrhunderts von Nordamerika nach Europa eingeschleppt und verursachten katastrophale Schäden. Der pilzliche Erreger des Echten Mehltaus (*Erysiphe* (syn. *Uncinula*) *necator* Schwein. 1834) gelangte um 1847 nach Europa und bewirkte Ernteausfälle von bis zu 80 % (Creasy & Creasy 2009). Etwa 1863 wurde die Reblaus (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) eingeschleppt, die „langsam aber sicher alle europäischen Weinreben tötet, die sie erreichen kann“ (Ordish 1987). Nur durch ein Aufpfropfen der *Vitis vinifera* Sorten auf amerikanische Wildreben mit Wurzelreblausresistenz oder -toleranz konnte der Weinbau „gerettet“ werden (Campbell 2004). Tragischerweise wurde mit der Einfuhr solcher Unterlagsreben im Jahr 1878 ein weiteres Rebenpathogen eingeschleppt. Der Oomycet *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni 1888 befällt als Erreger des Falschen Mehltaus alle grünen Teile des Rebstockes, welche er über die Spaltöffnungen (Stomata) infizieren kann (Müller & Sleumer 1934). Starke Infektionen an Blättern und Trieben führen zu hohen Blattverlusten bis hin zur kompletten Entlaubung. Kommt es zu einem starken Befall vor oder während der Blüte kann dies zu einem totalen Ernteausfall führen (Mohr 2005; Nicholas *et al.* 1994).

Das Auftreten der Mehltaupilze im Weinbau erfordert jährlich hohe Fungizidaufwendungen um Schäden und Ernteausfälle an den Reben zu vermeiden. In der Europäischen Union werden 58 % der Fungizide in Rebanlagen ausgebracht. Die mit Reben bestockte landwirtschaftlichen Nutzfläche beträgt jedoch nur etwa 5 % (siehe Tabelle 1). Das unausgewogene Verhältnis verdeutlicht den im Vergleich zu allen anderen Kulturen äußerst intensiven Pflanzenschutzinsatz.

Dieser hohe Aufwand an Fungiziden im Weinbau ist einen beträchtlicher Kosten- und Arbeitsfaktor für den Winzer und belastet zudem die Umwelt stark. Wünschenswert sind daher Reben, welche Resistenzen gegenüber den Mehltaukrankheiten aufweisen und zudem alle wichtigen weinbaulichen Eigenschaften wie Qualität, Ertrag, Wuchsform, usw. aufweisen. Die Entwicklung von Reben mit diesen Eigenschaften ist das Ziel der Resistenzzüchtung (Töpfer *et al.* 2011a).

Tabelle 1: Landwirtschaftliche Anbauflächen und Fungizidmengen der Hauptkulturen in der Europäischen Union. Angabe der Mittelwerte von 5 Jahren (1999-2003). Quelle: Eurostat (2007)

	Anbaufläche		Fungizideinsatz	
	ha	%	t	%
Getreide	43974000	59.8	11433	7.5
Mais	10023000	13.6	0	0.0
Raps	7393000	10.1	1035	0.7
Reben	3573000	4.9	88325	58.2
Obst	3119000	4.2	25202	16.6
Zuckerrübe	2304000	3.1	1521	1.0
Kartoffel	2302000	3.1	10497	6.9
Gemüse	794000	1.1	13720	9.0

1.1 Resistenzzüchtung bei Reben

Bei der Rebenzüchtung für die Weinproduktion stellen eine hohe Weinqualität, gute Resistenzeigenschaften und die Anpassung an die gegebenen klimatischen Bedingungen die Hauptziele dar (Töpfer *et al.* 2011b). Die Kulturform der europäischen Rebe *V. vinifera* ist bis auf wenige Ausnahmen hoch anfällig gegen die Mehltauerreger. Deshalb nutzt die Resistenzzüchtung vor allem Resistenzmerkmale aus Wildformen, die durch gezieltes Einkreuzen in den Genpool der qualitätsbetonten Kulturformen eingebracht wurden.

1.1.1 Genetische Ressourcen für Resistenz

Resistenzquellen gegen die Mehltaupilze stellen vor allem amerikanische, aber auch einige asiatische Wildreben dar (Alleweldt & Possingham 1988; Di Gaspero & Cipriani 2003; Eibach *et al.* 2011). Allerdings weisen sie in aller Regel auch für den Weinbau unerwünschte Eigenschaften, allen voran eine mangelhafte Weinqualität, auf. Wiederholte Rückkreuzungen mit *V. vinifera*-Sorten sind daher erforderlich, um diese negativen Eigenschaften aus dem Zuchtmaterial zu eliminieren. Die Anfänge der gezielten Resistenzzüchtung gingen zunächst auf Kreuzungen mit amerikanischen Wildreben zurück. Diese anfangs in Nordamerika und später in Frankreich konzentrierten Aktivitäten führten zur Gruppe der sogenannten amerikanischen bzw. französischen Hybriden. Sie hatten vielfach zwar durchaus gute Resistenzeigenschaften, waren aber wegen noch mangelnder Weinqualität für den Anbau meist ungeeignet (Töpfer *et al.* 2011a). Allerdings wurden sie später auch in vielen anderen Ländern als Ausgangsmaterial in Rückkreuzungsprogrammen eingesetzt, aus denen viele der heutigen pilzwiderstandsfähigen Rebsorten hervorgegangen sind (z. B. ‘Bianca’, ‘Johanniter’, ‘Medina’, ‘Phoenix’, ‘Regent’, ‘Zalagyöngye’, u.v.m.) (Europäische Kommission 2002).

Obwohl die Mehltaupilze in Asien nicht endemisch sind konnten auch dort Wildarten mit Resistenzeigenschaften identifiziert werden (Eibach *et al.* 2011). Über eine mögliche Co-Evolution mit in Asien endemischen verwandten *Plasmopara*-Arten wurde spekuliert (Jürges *et al.* 2009; Schröder *et al.* 2011). *Vitis amurensis* Ruprecht ist eine der asiatischen Wildreben bei der Genotypen mit Resistenzeigenschaften gegenüber den Mehltaukrankheiten gefunden wurden (Wan *et al.* 2007). In China und in einigen Ländern der ehemaligen Sowjetunion wurde *V. amurensis*, die sich auch durch eine äußerst hohe Winterfrost-Toleranz auszeichnet, bereits sehr früh und umfangreich in der Rebenzüchtung genutzt. (Becker 1981; Shtin & Filippenko 1974). Im Gegensatz zu vielen der amerikanischen Wildarten weist *V. amurensis* keinen „Fuchsgeschmack“ (Fox-Ton) auf, besitzt jedoch einen „uns fremden Geschmack“

(Becker 1981). Dieser ist in Kreuzungen der ersten Generation auch noch vorhanden, während nach Becker (1981) Weine aus Rückkreuzungen der zweiten Generation bereits ohne jeden Fremdgeschmack sein können. Weiterführende Kreuzungen zwischen französischen Hybriden und *V. amurensis* Resistenzträgern ergaben bereits neue Sorten (z.B. ‘Bronner’, ‘Solaris’, ‘Viktor’) und vielversprechendes Zuchtmaterial mit hoher Resistenz und guten weinbaulichen Eigenschaften (Becker 1996; Csizmazia 1993; Hoffmann *et al.* 2007; Kozma 2000).

1.1.2 Markergestützte Selektion

Genetische Marker nutzen die DNA, die in identischer Kopie in allen Zellen und Geweben der Pflanze vorkommt. Dadurch sind diese Marker unabhängig vom Entwicklungsstadium, den Umwelteinflüssen und dem Gesundheitszustand der getesteten Pflanze (Sefc *et al.* 2009). Ist ein genetischer Marker mit einem spezifischen Merkmal gekoppelt, so lässt sich diese Eigenschaft in jedem Entwicklungsstadium nachweisen. Damit kann die Anwendung der MAS aufwendige und zeitintensive phänotypische Untersuchungen ersetzen. Elternsorten mit den gewünschten Eigenschaften lassen sich über die Marker gezielt auswählen und in der Kreuzungszüchtung verwenden. Über die MAS lassen sich anschließend bereits im Sämlingsstadium die Genotypen der Nachkommenschaft selektieren, denen diese Eigenschaften vererbt wurden. Dies ist unabhängig davon, ob die Merkmale zu diesem Zeitpunkt bereits physiologisch ausgebildet wurden. In der Rebenzüchtung spielen qualitative und physiologische Merkmale der Traube eine große Rolle. Der Sämling bildet jedoch erst nach drei bis vier Jahren die ersten Fruchtausätze, was dann erstmalig eine Überprüfung der Beeren erlaubt. Eine umfangreiche Evaluierung der Weinqualität ist sogar erst nach fünf bis acht Jahren möglich (Töpfer *et al.* 2011b). Bei Tafeltrauben ist unter anderem das Merkmal der „Samenlosigkeit“ ein wichtiges Selektionskriterium (Mejia *et al.* 2011). Sind genetische Marker für solche Merkmale verfügbar, ist eine frühzeitige Selektion des Zuchtmaterials auf diese Eigenschaften möglich, was zu einem Zeitgewinn von mehreren Jahren führt. Auch komplexe Merkmale mit mehreren genetischen Komponenten können durch die molekularen Marker erfasst und im Zuchtverlauf berücksichtigt werden (Töpfer *et al.* 2011b).

In der Resistenzzüchtung erlauben die molekularen Marker eine zielgerichtete Kombination unterschiedlicher Resistenzmechanismen in einer neuen Sorte (Pyramidisierung), was zu einer breiten und dauerhaften Resistenz führt (Eibach *et al.* 2007). Eine stabile Resistenz ist bei der Rebe besonders wichtig, da sie als Dauerkultur für 30 oder mehr Jahre im Weinberg verbleibt. Gelingt es den Pathogenen die Resistenzmechanismen zu umgehen, so ist der züchterisch

aufwendig erarbeitete Vorteil verloren und ein vollständiger Pflanzenschutz wieder notwendig. Das Roden und eine Neupflanzung von Sorten mit verbesserten Resistenzeigenschaften kommt jedoch, vor allem für junge und mittelalte Anlagen, aus wirtschaftlichen Gründen nicht in Frage. Damit spielt die Stabilität der Resistenz eine weit größere Rolle im Anbau von Dauerkulturen als es für einjährige Pflanzen der Fall ist, zumal züchterische Erfolge auch erst sehr langsam in die Anbaupraxis integriert werden können. Deshalb ist es in der Rebenzüchtung ratsam, verschiedene Resistenzmechanismen gezielt zu kombinieren, um die Gefahr des Resistenzbruches zu minimieren. Dabei ist es empfehlenswert, nicht nur auf eine Kombination, sondern auf mehrere unterschiedliche Arten der Resistenzpyramidisierung zu setzen. Besonders in Weinbaugebieten kann ein Anbau von Sorten mit unterschiedlichen Pyramidisierungsvarianten einer einseitigen Selektion der Pathogene vorbeugen. (Schwander *et al.* 2011; Töpfer *et al.* 2011b) Die Fähigkeit von Pathogenen pflanzliche Resistenzbarrieren zu überwinden konnte bereits mehrfach beobachtet werden (McDonald & Linde 2002). Bei der Rebe konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein tschechisches *P. viticola*-Isolat den rassen-spezifischen *Rpv3* Resistenzlocus überwunden hat (Peressotti *et al.* 2010). Dies zeigt, wie wichtig ein zielgerichtetes Zusammenführen von Resistenzen ist. Dabei hängt die benötigte Anzahl der zu pyramidisierenden Resistenzloci pro Pathogen vom Resistenzgrad ab, den die einzelnen Loci vermitteln. Dennoch sollten generell mindestens zwei, besser drei Resistenzloci pro Pathogen kombiniert werden (Schwander *et al.* 2011). Die Anstrengungen dürfen sich dabei nicht nur auf die Mehltaukrankheiten beschränken, denn weitere, bisher meist durch die Zusatzwirkung der eingesetzten Fungizide eher unbedeutende Krankheiten, wie beispielsweise Schwarzfäule, Roter Brenner, Phomopsis und Anthraknose könnten bei reduziertem Fungizideinsatz an Bedeutung gewinnen. In einigen deutschen Anbaugebieten wurden bereits erhebliche Schäden durch Schwarzfäulebefall in Anlagen mit pilzwiderstandsfähigen Neuzüchtungen beobachtet (Lipps & Harms 2004). Erste Resistenzloci gegen die Schwarzfäule sind in der Unterlagssorte 'Börner' identifiziert worden und werden der Züchtung in naher Zukunft zur Verfügung stehen (F. Rex, Dissertation in Vorbereitung).

Die Entwicklung merkmalsgekoppelter molekularer Marker ist zwingende Voraussetzung um ein Merkmal in der markergestützten Züchtung berücksichtigen zu können. Je mehr Merkmale so erfasst sind, desto besser lassen sich geeignete Kreuzungseltern auswählen um schnelle und umfangreiche Erfolge erzielen zu können. Mit einer frühzeitigen markergestützten Selektion der Nachkommen aus solchen Kreuzungen lässt sich der Arbeitsaufwand durch das Fokussieren auf wenige relevante Genotypen deutlich verringern. Der Einsatz

molekularer Marker in der Rebenzüchtung erlaubt damit einen gezielten und wissensbasierten Zuchtlauf durch die Auswahl geeigneter Kreuzungseltern und eine frühzeitige Selektion der Nachkommen auf wichtige Eigenschaften. Dies ermöglicht eine starke Verkürzung der Zuchtdauer von bis zu 10 Jahren (Töpfer *et al.* 2011b).

1.2 Falscher Mehltau der Rebe

Der Schaderreger des Falschen Mehltaus bei der Rebe ist *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni 1888. Das Pathogen ist auf den wildwachsenden Rebarten Nordamerikas heimisch und wurde im Jahr 1878 nach Europa eingeschleppt. *P. viticola* gilt seitdem als die gefährlichste „pilzliche“ Rebenkrankheit Mitteleuropas (Mohr 2005; Müller & Sleumer 1934). Befallen werden alle grünen Gewebe der Rebe, die Spaltöffnungen (Stomata) aufweisen (Blätter, junge Triebe, Gescheine, junge Beeren). Die Symptome des Blattbefalls zeigen sich durch die Ausbildung sogenannter „Ölflecken“, Aufhellungen an der Blattoberseite durch einen Chlorophyllabbau aufgrund des Nährstoffentzugs (Abbildung 1a, b). Auf der Blattunterseite entsteht nach einer feuchtwarmen Nacht ein mehlarziger Belag, der durch die asexuellen Fortpflanzungsorgane (Sporangienträger) entsteht (Abbildung 1b). Später werden die befallenen Stellen nekrotisch und starker Befall kann eine vollständige Entlaubung verursachen. Kommt es vor oder während der Blüte zu einem Befall von Gescheinen, so entwickeln sich sogenannte „Lederbeeren“ (Abbildung 1c). Dabei trocknen die Beeren ein und die Beerenhaut wird lederartig zäh. Ein solcher Befall kann zu einem Totalausfall der Ernte führen (Mohr 2005; Nicholas *et al.* 1994).



Abbildung 1: Schadbild des Falschen Mehltaus. a) Infizierte Blätter mit „Ölflecken“ und ersten Nekrosen. b) „Ölflecken“ auf der Blattoberseite und durch die Sporangienträger gebildeter mehlarziger Belag auf der Blattunterseite. c) Nach dem Befall der jungen Gescheine entstandene „Lederbeeren“.

1.2.1 Infektionszyklus und –verlauf

Plasmopara viticola wird taxonomisch in die Familie der Peronosporaceae innerhalb der Klasse der Oomyceten („Eipilze“) eingeordnet (Tabelle 2). Obwohl Oomyceten und Echte Pilze (Eumycota) eine ähnliche Lebensweise aufweisen sind die Oomyceten näher mit den Algen verwandt (Hardham 2007).

P. viticola besitzt eine obligat biotrophe Lebensweise, was bedeutet, dass er sich nur von lebendem pflanzlichen Gewebe ernähren und darauf fortpflanzen kann (Burrano 2000).

Die Verbreitung erfolgt über einen sexuellen und einen vegetativen Fortpflanzungszyklus (vgl. Abbildung 2). Geschlechtlich gebildete Oosporen von *P. viticola* gelangen mit dem Falllaub in den Boden, wo diese überwintern und auch mehrere Jahre überdauern können. Ab einer Temperatur von 11°C beginnen die Oosporen zu keimen und bilden Primärsporangien aus. Kommen diese mit flüssigem Wasser in Berührung, entlassen sie eine große Anzahl begeißelter Zoosporen. Durch spritzende Regentropfen können die Zoosporen vom Boden auf die Unterseite der Blätter gelangen. Dort schwimmen sie aktiv durch den Wasserfilm zu den Spaltöffnungen (Stomata) und dringen durch diese mit einem Infektionsschlauch in die Atemhöhle des Blattes ein (Mohr 2005; Müller & Sleumer 1934). Dabei orientieren sie sich an einen noch unbekanntem Wirtsfaktor, der über die Stomata abgegeben wird (Kiefer *et al.* 2002). Erreicht der Infektionsschlauch eine pflanzliche Zellwand, so bildet er ein Appressorium aus, womit er die Zellwand durchdringt um im engen Kontakt mit der Zellmembran ein Haustorium zu etablieren. Das Haustorium dient der Versorgung des Parasiten mit Nährstoffen aus der lebenden Pflanzenzelle. Anschließend werden weitere Hyphen ausgebildet, mit denen sich *P. viticola* durch die Interzellularräume weiter ausbreitet (Kortekamp *et al.* 1998). Die Ausbreitungsgeschwindigkeit und damit auch die Inkubationszeit sind abhängig von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit. Unter optimalen Bedingungen bei einer relativen Luftfeuchte von 100 % und 22 bis 25°C wurde bereits nach 2,5 Tagen die Ausbildung erster Sporangienträger beobachtet. Durchschnittliche Inkubationszeiten unter natürlichen Bedingungen liegen jedoch eher zwischen 5 und 18 Tagen (Müller & Sleumer 1934). Die Sporangienträger treten durch die Stomata aus dem Gewebe hervor und bilden baumartige Strukturen aus, an deren verzweigten Enden asexuelle Sporangiosporen entstehen (Kortekamp *et al.* 1998). Die Sporangiosporen werden durch Wind und Regen verfrachtet und

Tabelle 2 Taxonomische Einordnung von *Plasmopara viticola* nach <http://www.speciesfungorum.org/>.

Domäne	Chromista
Stamm	Oomycota
Klasse	Oomycetes
Ordnung	Peronosporales
Familie	Peronosporaceae
Gattung	Plasmopara
Art	<i>Plasmopara viticola</i>

sind für die epidemische Ausbreitung mit mehreren Zyklen über die Vegetationsperiode verantwortlich. Auch sie bilden und entlassen wie die Primärsporangien unter feuchtwarmen Bedingungen mehrere Zoosporen, welche einen erneuten Infektionszyklus hervorrufen (Mohr 2005). Begegnen sich im Gewebe zwei gegengeschlechtliche (heterothallische) Hyphen, dann kommt es vermehrt im Herbst zu einer sexuellen Vermehrung, bei der die winterharten Oosporen für die Neuinfektion im nächsten Jahr gebildet werden (Wong *et al.* 2001).

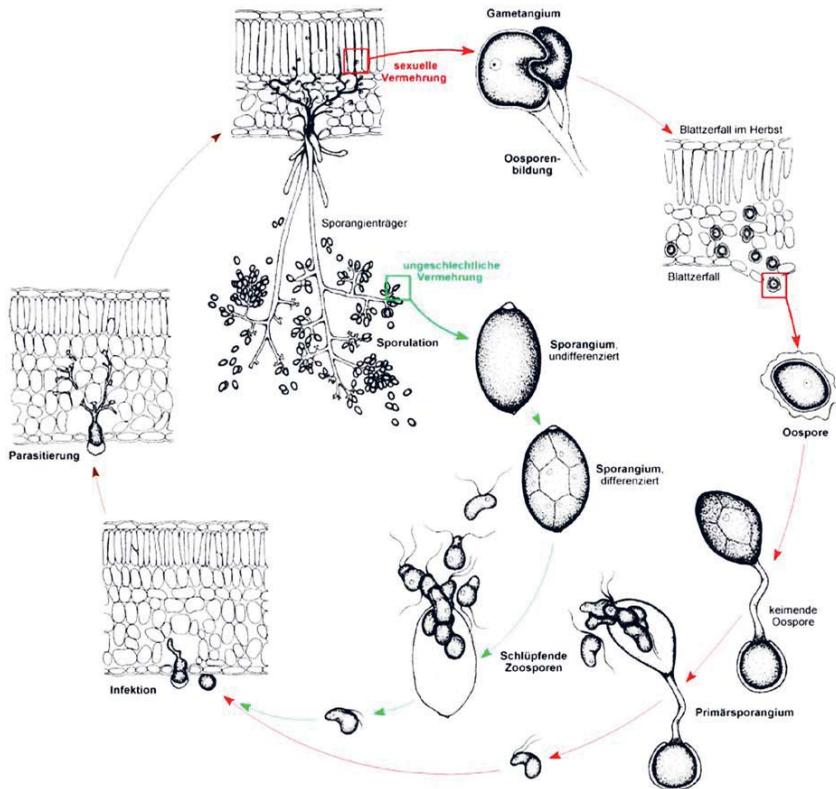


Abbildung 2: Schematischer Infektionszyklus von *Plasmopara viticola*. Der äußere (rote) Zyklus stellt die sexuelle Vermehrung dar, während der innere (grüne) Zyklus die asexuelle Vermehrung während der Vegetationsperiode zeigt (Quelle: Gobbin 2004).

Genetische Studien an *P. viticola* Isolaten in Europa konnten zeigen, dass dieses Pathogen eine sehr hohe genetische Diversität aufweist (Gobbin *et al.* 2006; Gobbin *et al.* 2003; Scherer & Gisi 2006). Dies kann eine Erklärung für die schnelle und erfolgreiche Ausbreitung nach

dem Einschleppen in ganz Europa und jüngere Beobachtungen zum Überwinden von Resistenzen sein (Bellin *et al.* 2009; Gobbin *et al.* 2006). Aktuelle Untersuchungen konnten weitere phylogenetisch unterscheidbare *Plasmopara*-Stämme auf amerikanischen *Vitis* Arten nachweisen (Schröder *et al.* 2011). Diese Erkenntnisse zeigen, wie wichtig umfangreiche und effektive Zuchtstrategien für eine zukunftsfähige Resistenzzüchtung sind.

1.2.2 Bekämpfungsstrategien

Kupferkalkbrühe, auch als „Bordeauxbrühe“ bezeichnet, stellte das erste wirksame Bekämpfungsmittel gegen den Falschen Mehltau dar. Ursprünglich erfolgte deren Einsatz um Traubendiebstähle an Landstraßen zu vermeiden, wobei auffiel, dass derartig behandelte Rebstöcke keine Symptome aufwiesen (Müller & Sleumer 1934). Die fungitoxische Wirkung des Kupfers (Kupferoxychlorid, Kupferhydroxid, Kupferoktanoat) wird auch heute noch vor allem im ökologischen Weinbau genutzt, da dies dort die einzige zugelassene und zuverlässig wirkende Bekämpfungsmöglichkeit ist (Berkelmann-Löhnertz *et al.* 2008).

Im deutschen Weinbau sind chemische Fungizide gegen den Falschen Mehltau aus acht Wirkstoffkategorien, oft auch als Kombinationspräparate, zugelassen. Um Resistenzbildungen vorzubeugen dürfen Präparate einer Wirkstoffklasse höchstens dreimal in einer Vegetationsperiode eingesetzt werden (Staatliches Weinbauinstitut Freiburg 2011). Dabei ist eine kurative Wirksamkeit meist nur eingeschränkt gegeben, weshalb die Behandlungen weitgehend protektiv durchgeführt werden (Kassemeyer 2008). Um die Aufwendungen an Fungiziden möglichst gering zu halten und dennoch einen ausreichenden Pflanzenschutz zu erzielen sind computergestützte Prognosemodelle (z. B. <http://www.vitimeteo.de>) im Einsatz. Anhand der Wetterdaten werden die wichtigsten Schritte im Lebenszyklus von *P. viticola* ermittelt, was eine Bewertung der Infektionsrisiken erlaubt und gezielte Spritzungen ermöglicht (Bleyer 2008). Eine weitere, drastische Reduktion der Fungizidmenge ermöglicht den Anbau resistenter Neuzüchtungen.

1.3 Pflanzliche Resistenzen

Pflanzen schützen sich durch vielfältige Abwehrmechanismen vor Phytopathogenen. Zeigen diese gegen ein bestimmtes Pathogen keine Wirkung, so ist die Pflanze anfällig (suszeptibel). Es gelingt dem Pathogen die Pflanze zu besiedeln und es kann auf ihr seinen Lebenszyklus durch Sporenbildung beenden (kompatible Interaktion). Die am häufigsten vorkommende und dauerhafteste Form der pflanzlichen Pathogenresistenz ist die Immunität einer Pflanzen-

Spezies gegen alle Mitglieder einer Pathogen-Spezies. Sie wird als Nichtwirtsresistenz bezeichnet und ist der Grund dafür, dass die pflanzliche Resistenz gegen Pathogene die Regel ist und Anfälligkeit die Ausnahme darstellt (Heath 2000b). Dennoch ist sie die am wenigsten verstandene Art der Resistenz (Mysore & Ryu 2004). Sie besteht aus einem mehrschichtigen Abwehrsystem, bei dem sowohl präformierte, als auch induzierte Resistenzen wichtige Komponenten darstellen (Ferreira *et al.* 2006). Die Induzierbarkeit von Abwehrmechanismen setzt eine Erkennung des Pathogens voraus, die bei der Nichtwirtsresistenz unspezifisch über PAMPs („pathogen-associated molecular pattern“) erfolgt. Bei der Wirtsresistenz erfolgt dagegen eine rassenspezifische Erkennung über Resistenz (R)-Gene (Jones & Takemoto 2004).

1.3.1 Präformierte Resistenz

Präformierte Barrieren der Pflanze bilden die erste Hürde, die ein Pathogen überwinden muss. Strukturelle Barrieren wie eine dicke hydrophobe Wachsschicht, die Cuticula und dicke Zellwände hindern das Pathogen am Eindringen (Nürnberger & Lipka 2005), aber auch die Actin-Mikrofilamente des Cytoskeletts sind an der Inhibition der pilzliche Penetration beteiligt (Kobayashi *et al.* 1997). Eine dichte Behaarung mit Trichomen, wie in Abbildung 7 dargestellt, konnte als effektive Resistenzbarriere gegen *P. viticola* in *Vitis* Wildarten nachgewiesen werden (Kortekamp & Zyprian 1999). Auch der Aufbau der Spaltöffnungen kann *P. viticola* das Eindringen in die Pflanze erschweren. So konnte bei resistenten Akzessionen von *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. californica* und *V. amurensis*, sowie bei vier von zehn *V. sylvestris*-Akkzessionen eine zusätzliche innere cuticuläre Kante an den Schließzellen identifiziert werden. Deren mögliche Funktion als präformierte Resistenzbarriere wurde diskutiert (Jürges *et al.* 2009; Schröder 2010). Das Fehlen von spezifischen Oberflächenstrukturen oder -elementen, wie sie von vielen Pathogenen zur Wirtserkennung benötigt werden, kann ebenfalls zur Resistenz führen (Thordal-Christensen 2003). Eine Infektion kann auch an chemischen Barrieren scheitern. Viele Pflanzen lagern besonders in Vakuolen und Organellen der äußeren Zellschichten antimikrobielle Sekundärmetabolite ein um Infektionen zu verhindern (Osborn 1996). Die Vielfalt der dabei beobachteten Komponenten ist enorm und umfasst unter vielen anderen phenolische und cyanogene Verbindungen, Lactone, Saponine und Stilbene (Dixon 2001). Nicht nur speziell vorgehaltene Stoffe sondern auch Mangelfaktoren, wie beispielsweise geringe Zucker-/Aminosäure-/Proteingehalte oder fehlende pflanzlichen Diffusate können eine Infektion verhindern. Für *P. viticola* konnte gezeigt werden, dass die Zoosporen in der Lage sind die Stomata aktiv

und zielgerichtet zu finden, was auf einen durch die geöffneten Stomata diffundierenden, sortenspezifischen Wirtsfaktor zurückzuführen ist (Kiefer *et al.* 2002). Die kleinen Aldehyde Nonanal und Decanal sind Kandidaten für solche Faktoren (Schröder 2010).

Diese Form der Resistenz schützt die Pflanze vor einem großen Teil der Mikroorganismen. Dennoch haben pathogene Organismen gelernt, diese zu umgehen, worauf die Pflanze mit der Entwicklung weiterer Abwehrmechanismen reagieren musste. Diese werden erst dann ausgelöst, wenn die Pflanze in Kontakt mit einem Pathogen kommt, weshalb sie als „induzierte Resistenzen“ bezeichnet werden (Ingle *et al.* 2006).

1.3.2 Pathogenerkennung

Eine Induzierbarkeit von Abwehrmechanismen setzt das Erkennen eines Pathogenbefalls durch die Pflanze voraus. Dazu besitzen pflanzliche Zellen RLK-Oberflächenrezeptoren („receptor like kinases“) auf der Plasmamembran mit denen molekulare, meist konservierte Strukturen von Pathogenen, so genannte PAMPs („pathogen-associated molecular pattern“), erkannt werden können (DeYoung & Innes 2006; Ingle *et al.* 2006). Zu den auch als Elizitoren bezeichneten PAMPs zählen verschiedene Komponenten der äußeren Hülle gramnegativer Bakterien wie die Lipopolysaccharide, die Peptidoglycane und das Flagellin der grampositiven Bakterien, methylierte bakterielle DNA-Fragmente, Chitine, Ergosterole und Proteine der pilzlichen Zellwand, sowie Glucane von Oomyceten (Chisholm *et al.* 2006; Nürnberger & Lipka 2005). Dies ermöglicht eine umfassende Pathogenerkennung und führt zur Aktivierung von Signalwegen wie der Mitogen-aktivierten-Protein-(MAP)-Kinase-Signalkaskade, dem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma oder der Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) oder reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Diese Signalwege induzieren die PAMP-getriggerte Immunantwort (PTI). Dies geschieht in vielen Fällen über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z. B. WRKYs), welche eine schnelle Expression von PR-Genen („pathogenesis related“) auslösen können (Chisholm *et al.* 2006; Nürnberger & Lipka 2005).

Einigen Pathogenen ist es während der Co-Evolution gelungen durch Avirulenz-(Avr)-Gene codierte Effektoren zu entwickeln, die eine Aktivierung der PTI unterbinden, indem sie die Signalkaskaden in der pflanzlichen Zelle aktiv unterbrechen. Daraufhin entwickelten die Pflanzen R-Gene, deren Produkte direkt oder indirekt spezifische Effektoren erkennen können und daraufhin die Effektor-getriggerte Immunantwort (ETI) auslösen (Chisholm *et al.* 2006; Mysore & Ryu 2004). Nach der Gen-für-Gen-Theorie kommt es an der Infektionsstelle zu einer Abwehrreaktion die durch eine Hypersensitive Reaktion (HR) gekennzeichnet ist, wenn

ein Virulenz-(Vir)-Gen des Pathogens durch ein pflanzliches R-Gen erkannt werden konnte. Fehlt das Vir- oder das R-Gen, so ist die Pflanze anfällig, da ein spezifisches Erkennen des Pathogens nicht möglich ist (Flor 1971). Die R-Gene können in fünf Klassen eingeteilt werden. Die umfangreichste und differenzierteste Klasse bilden die NBS-LRRs. Die Nucleotid-Bindestelle (NBS) wird für die Bindung von ATP oder GTP benötigt und gehört zu einer größeren Domäne, die Homologie mit eukaryotischen Zelltodeffektoren besitzt. Des Weiteren besitzen diese Proteine eine variable Anzahl von Leucin-reichen Wiederholungssequenzen (LRR, „leucine-rich-repeat“) am C-Terminus. Diese LRRs ermöglichen Interaktionen zwischen zwei Proteinen, zwischen Protein und Kohlenhydrat, sowie zwischen Peptid und Ligand und sind vermutlich für die spezifische Erkennung der Effektoren verantwortlich. Anhand ihrer N-terminalen Domäne können die NBS-LRRs in TIR-NBS-LRRs (toll/interleukine-1) und CC-NBS-LRRs (coiled-coil) unterschieden werden (Dangl & Jones 2001). Beide Typen kommen in der Rebe vor, wobei codierende Gene für 84 CC-NBS-LRRs, 37 TIR-NBS-LRRs und 112 unvollständige NBS-LRRs in der Sorte ‘Pinot Noir’ durch Genomsequenzierung identifiziert wurden (Gomès & Coutos-Thévenot 2009; Velasco *et al.* 2007). Nach einer *P. viticola*-Infektion an der resistenten Wildart *V. riparia* ‘Gloire de Montpellier’ kommt es dort zu einer spezifischen Expression von VRP1, einem strukturellen CC-NBS-LRR-Gen (Kortekamp *et al.* 2008). Über Primerbindestellen in konservierten NBS Regionen konnten bereits vor der Genomsequenzierung eine große Anzahl NBS-LRR in *Muscadinia* und *Vitis* Arten identifiziert und als Marker eingesetzt werden (Di Gaspero & Cipriani 2003; Donald *et al.* 2002). Die vier weiteren Klassen der R-Gene codieren für 1.) cytoplasmatische Serin/Threonin-Protein-Kinasen, 2.) extrazelluläre LRRs mit Membrananker, 3.) RLKs mit extrazellulärem LRR und mit einer intrazellulärer Serin/Threonin-Protein-Kinase und 4.) membranverankerte Proteine mit intrazellulärer CC-Domäne (Dangl & Jones 2001; Gomès & Coutos-Thévenot 2009).

1.3.3 Induzierte Resistenzen

Nach der Erkennung eines Pathogenbefalls kann es zu einer Vielzahl an Abwehrreaktionen der induzierten Resistenz kommen. Welche Kombination dieser Reaktionen ausgelöst wird, ist dabei abhängig von der jeweiligen Pflanze, dem Pathogen und dem aktivierten Signalweg. Eine häufige Reaktion führt zu Veränderungen und Verstärkungen von strukturellen Barrieren. Dabei werden starke Zellwandverdickungen, so genannte „Papillen“, am Ort der Infektion gebildet, welche Kallose sowie andere Polysaccharide, phenolische Verbindungen, reaktive Sauerstoffspezies und verschiedenartige Proteine enthalten (Flors *et al.* 2005). Damit

versucht die Pflanze das Pathogen abzukapseln bzw. an einer Penetration zu hindern. Bei der resistenten Rebsorte 'Solaris' wurde Kallosebildung an den Stomata nach einer *P. viticola* Infektion beobachtet (Gindro *et al.* 2003). Die Bildung chemischer Abwehrstoffe kann durch den Infektionsprozess in der Pflanze ebenfalls induziert werden. So kommt es innerhalb weniger Stunden zur lokalen Produktion von antimikrobiellen, niedermolekularen sekundären Pflanzenstoffen, den Phytoalexinen (Hammerschmidt 1999). In den Sorten 'Solaris' und 'Bronner' konnten eine starke Akkumulation von Phytoalexinen aus der Stoffklasse der Stilbene 48 Stunden nach einer *Plasmopara*-Inokulation beobachtet werden. Dabei kam es zur Bildung der fungitoxisch wirksamen Stilbene Resveratrol, δ - und ϵ -Viniferin, für die eine starke Hemmung der Zoosporenmobilität und der Sporangienträgerbildung nachgewiesen wurde (Pezet *et al.* 2004a; Pezet *et al.* 2004b).

Ebenfalls durch Pathogenbefall spezifisch induziert werden PR-Proteine („pathogenesis related proteins“), welche vor dem Befall in der Pflanze nicht nachweisbar sind und auf verschiedenste Arten antimikrobielle Wirksamkeit besitzen. Sie werden in 17 Klassen mit unterschiedlichen, teilweise noch unbekannt Funktionen (PR-1 und -17) unterteilt (Van Loon & an Strien 1999; van Loon *et al.* 2006b). Zu diesen sowohl lokal als auch systemisch gebildeten PR-Proteinen gehören Chitinasen (PR-3, -4, -8 und -11) und β -(1,3)-Glucanasen (PR-2), welche gezielt die pilzliche Zellwand angreifen. Auch Peroxidasen (PR-9), Proteinaseinhibitoren (PR-6), Endoproteinasen (PR-7), Thionine (PR-13), Defensine (PR-12), Lipid-Transfer-Proteine (PR-14), Oxalatoxidasen (PR-15 und -16) und Proteine, die Ähnlichkeit zu Thaumatin (PR-5) oder Ribonucleasen (PR-10) besitzen, werden zu den PR-Proteinen gezählt (van Loon *et al.* 2006b). Auch in der Rebe konnten Vertreter aus den verschiedenen Klassen von PR-Proteinen (mit Ausnahme von PR-13) bereits nachgewiesen oder in BLAST-Analysen identifiziert werden (Gomès & Coutos-Thévenot 2009).

Ein weiterer Abwehrmechanismus besteht in der Erhöhung der Konzentration an ROS wie dem Superoxidation ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikal (OH^{\cdot}). Dieser Vorgang wird als „Oxidative Burst“ bezeichnet. Verantwortlich für die Bildung der ROS sind Oxydasen, deren Produkte sowohl lokal (OH^{\cdot}), als auch nach Diffusion aus der Zelle (H_2O_2) wirken können. Diese Radikale sind in viele verschiedene Vorgänge der Pathogenabwehr involviert. Dabei können sie direkt antimikrobiell wirksam sein, zu strukturellen Veränderungen der Zellwand durch Vernetzung führen, die Genexpression von Resistenzgenen veranlassen oder die Hypersensitive Reaktion (HR) auslösen (Lamb & Dixon 1997; Wojtaszek 1997). Bei der HR handelt es sich um ein, durch biotischen oder abiotischen Stress hervorgerufenen, schnelles Absterben von Zellen am Ort der Infektion. Die HR beinhaltet

dabei sowohl den programmierten Zelltod mit charakteristischen Nekrosen, als auch die Induktion weiterer pflanzlicher Abwehrreaktionen, die zu einem Schutz der Pflanze führen (Heath 2000a; Lam *et al.* 2001). Dabei wird das Pathogen an der Infektionsstelle gestoppt oder sogar getötet. Die HR gilt als charakteristische Resistenzantwort für eine rassenspezifische Pathogenerkennung nach der Gen-für-Gen-Theorie. Da sie somit nur gegen eine oder wenige pathogene Rassen wirksam ist, kann die Resistenz durch Entwicklungen in der Pathogenpopulation bereits nach wenigen Jahren gebrochen werden (Király *et al.* 2007). Ein solcher Resistenzbruch konnte in der Rebe bei dem HR-induzierenden *Rpv3*-Locus beobachtet (Peressotti *et al.* 2010) und detailliert untersucht werden (Casagrande *et al.* 2011). Durch das Erkennen eines Pathogens können von der befallenen Zelle neben lokalen auch systemische Resistenzreaktionen (SAR = „systemic acquired resistance“) ausgelöst werden, um Sekundärinfektionen an der Pflanze zu verhindern. Dies geschieht über niedermolekulare Signalsubstanzen wie Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen. Dabei wirken die SA- und JA-abhängigen Signalwege antagonistisch auf die Stärke der Resistenzantwort. (Chisholm *et al.* 2006; Xu *et al.* 2011). Es hat sich gezeigt, dass die unterschiedlichen Signalwege auf verschiedene Pathogentypen spezifisch reagieren, wodurch es zu differenzierten Resistenzantworten kommen kann. An Rebblättern führten Behandlungen mit Methyljasmonsäure oder SA, sowie der Infektion mit unterschiedlichen Pathogenen, zu differentiellen Expressionsmustern verschiedener Abwehr- und Signalproteine (Chong *et al.* 2008).

Damit steht den Pflanzen ein breites Spektrum an Abwehrmechanismen zur Verfügung, die einen umfangreichen, aber keinen vollständigen Schutz gegen Pathogene vermitteln können. Da die Entwicklung der kultivierten Rebsorten in Abwesenheit der eingeschleppten heutigen Hauptpathogene (Echter und Falscher Mehltau, Reblaus oder auch Schwarzfäule) erfolgte, besitzen sie meist keine effektive Abwehrreaktion gegen diese. Die einzige bekannte Ausnahme stellt bislang der *Ren1*-Locus gegen den Echten Mehltau von ‘Kishmish Vatkana’ und ‘Dzhandzhal Kara’ dar (Coleman *et al.* 2009; Hoffmann *et al.* 2008; Töpfer *et al.* 2011b). Somit ist die Introgression von Resistenzen aus amerikanischen und asiatischen Wildarten ein geeigneter Weg um, funktionelle Resistenzmechanismen für den Anbau von Qualitätsreben nutzbar zu machen.

1.4 Genetische Kartierung

Kartierungsarbeiten werden z. B. mit SSR-Markern („simple sequence repeats“) durchgeführt. Dabei handelt es sich um Wiederholungen kurzer Sequenzabschnitte von meist 2 bis 6 Basen, welche auch als Mikrosatelliten bezeichnet werden. Durch die Sequenzhomogenität dieser Abschnitte entsteht eine erhöhte Variabilität in der Anzahl an Wiederholungen. Bei der Verwendung SSR-flankierender Primer in diploiden Organismen wie der Rebe, lassen sich spezifische Fragmentlängen für die beiden Allele ermitteln. SSR-Marker sind somit codominant und lassen sich verwenden, um die Allelmuster von Genotypen einer Kreuzungspopulation an einem Locus zu bestimmen. Für SSR-Loci werden Mutationsraten zwischen 1×10^{-4} und 5×10^{-6} pro Meiose angenommen. Damit liegen die Mutationsraten deutlich höher als in codierenden Sequenzbereichen, aber auch nicht so hoch wie bei hypervariablen Minisatelliten mit 10^{-2} Mutationen pro Meiose (Gobbin *et al.* 2003). Für Reben konnte gezeigt werden, dass die SSR-Marker über die *Vitis* und *Muscadinia* Arten recht gut konserviert sind und codominant vererbt werden. Damit zeigen SSR-Marker optimale Eigenschaften für Kartierungs- und Abstammungsanalysen (Sefc *et al.* 2009).

1.4.1 Erstellen der genetischen Karte

Um eine genetische Karte zu erstellen, werden Markerdaten für jedes Individuum einer Kreuzungspopulation erhoben. Anhand der Rekombinationsfrequenzen lassen sich Kopplungen zwischen den Markern feststellen und deren genetische Distanz bestimmen. Je näher zwei Marker beieinander liegen, desto seltener sind die Rekombinationsereignisse, desto geringer die genetische Distanz. Diese wird in centi Morgan (cM) angegeben, wobei ein cM einer Rekombinationsrate von einem Prozent entspricht. Da die starke Inzuchtdepression von Reben die Verwendung parentaler Inzuchtlinien ausschließt, verwendet man zur genetischen Kartierung F1-Kreuzungspopulationen heterozygoter Eltern. Unter Annahme einer hohen Heterozygotie werden dabei nach der „Double Pseudo-Testcross“-Strategie von Grattapaglia & Sederoff (1994) zunächst zwei elterliche Kopplungskarten erstellt, die anschließend in einer integrierten Karte zusammengeführt werden. Dafür verwendet das in dieser Arbeit genutzte Programm JoinMap 4 (Van Ooijen 2006) die gewichteten kleinsten Quadrate, um die integrierten genetischen Distanzen abzuschätzen. Somit ist es möglich, neben den vollinformativen Markern, auch solche in der Karte zu positionieren, die nur in einem Elternteil heterozygot sind und deshalb in der Nachkommenschaft 1:1 aufspalten

(Muster wie im Fall einer Rückkreuzung) oder eine 3:1 Aufspaltung (Muster einer F2-Nachkommenschaft) aufweisen (Grattapaglia & Sederoff 1994; Stam 1993; Van Ooijen 2006)

1.4.2 QTL-Analyse

Die Bereiche in einem Genom, die für die Ausprägung eines quantitativen Merkmals verantwortlich sind, lassen sich über QTL-Analysen statistisch erfassen. Die verfügbaren Methoden reichen vom einfachen statistischen Test einzelner Marker (z.B. Varianzanalyse, t-Test, einfache lineare Regression) bis zu komplexen Modellen zum Testen mehrerer Marker und Wechselwirkungen (Doerge 2002). Die beiden leistungsstarken Methoden Interval Mapping (IM) und Multiple QTL Mapping (MQM), die für die Analysen in dieser Arbeit verwendet wurden, sind additiv und ermöglichen die Berechnung zuverlässiger QTLs für annähernd normalverteilte Datensätze.

1.4.2.1 Interval Mapping

Die Methode des Interval Mapping (IM) wurde von Lander & Botstein (1989) entwickelt und berechnet unter Einbeziehung der beiden benachbarten Marker für jede Position des Genoms die Wahrscheinlichkeit für einen segregierenden QTL. Zeitgleich erfolgt eine Berechnung des genetischen Effekts eines QTL und die verbleibende Varianz wird ermittelt (Van Ooijen 1994). Die Ausprägung des QTL wird durch den LOD-Wert („logarithm of odds“) beschrieben. Dieser gibt den dekadischen Logarithmus des Quotienten zwischen der Wahrscheinlichkeit für einen segregierenden QTL und der angenommenen Nullhypothese für keinen genetischen Effekt an. Übersteigt der ermittelte LOD-Wert für eine Position die Signifikanzgrenze, so wird eine genetische Kopplung des untersuchten Merkmals mit dieser Position angenommen. Die Signifikanzgrenze lässt sich durch einen Permutationstest mit einer ausreichenden Anzahl an Vertauschungen ermitteln (Churchill & Doerge 1994). Typischerweise wird der LOD-Wert als Signifikanzgrenze verwendet, welcher einen Fehler von 0,05 (5 %) aufweist (Van Ooijen 2009). Um die Position eines Locus zu beschreiben, wird ein Konfidenzintervall angegeben. Die am häufigsten verwendeten Konfidenzintervalle sind der 1-LOD bzw. 2-LOD, die einen Intervall zwischen den Positionen beschreiben, an denen der maximale LOD-Wert minus eins bzw. zwei erreicht wird. Entsprechend der logarithmischen Angabe des LOD-Wertes ist die Wahrscheinlichkeit an diesen Positionen gegenüber dem Maximum entsprechend 10- bzw. 100-fach reduziert. Aus Modellberechnungen ist bekannt, dass der QTL beim 1-LOD-Intervall etwa 80 % Aussagewahrscheinlich-

keit besitzt, während diese beim 2-LOD-Intervall etwa 95% beträgt, wie sie in der biologischen Forschung meist gefordert ist. Dabei sind diese Angaben nur als Richtwerte zu sehen, da sie stark von der verwendeten Individuenanzahl und dem Anteil des QTL an der Varianz beeinflusst werden (Van Ooijen 1992). Ein limitierender Faktor bei der IM-Analyse stellt die zugrundeliegende Modellannahme eines einzelnen QTL dar. Dadurch ist es möglich, dass weitere QTLs nicht detektiert werden können. Darum empfiehlt sich eine nachgeschaltete MQM-Analyse (Costantini *et al.* 2009; Doerge 2002).

1.4.2.2 Multiple QTL Mapping

Bei den Berechnungen mit der Multiple QTL Mapping Methode (Jansen 1993; Jansen 1994; Jansen & Stam 1994) werden QTL-nahe Marker als Cofaktoren gewählt und in die Berechnungen der Wahrscheinlichkeiten einbezogen. Die verbleibende Varianz wird dabei reduziert und der Effekt des QTL von dem eng gekoppelten Marker absorbiert. Dadurch wird die Möglichkeit geschaffen weitere, meist schwächer ausgeprägte QTLs zu identifizieren, sofern solche vorhanden sind. Zudem besitzt diese Methode das Potential stark ausgeprägte QTLs präziser zu lokalisieren, was in reduzierten Konfidenzintervallen resultieren kann (Van Ooijen 1994).

1.5 Zielsetzung

Die Arbeiten wurden mit dem Ziel durchgeführt, eine neue Resistenzquelle gegen den Falschen Mehltau der Rebe (*Plasmopara viticola*) für die markergestützten Züchtung zu erschließen. Die aus der asiatischen Wildrebe *Vitis amurensis* stammenden Resistenzeigenschaften sollten dafür mit Hilfe einer spaltenden Kreuzungspopulation im Genom lokalisiert werden. Merkmalsgekoppelte molekulare Marker sollten dabei identifiziert und der/die Bereich/e durch die Entwicklung neuer Marker weiter eingeschränkt werden. Diese Marker sollten anschließend auf ihre Einsatzfähigkeit in der Züchtung getestet werden. Dabei können sie genutzt werden, um genetische Ressourcen, welche diese Resistenz aufweisen, zu identifizieren, um diese dann gezielt als Kreuzungseltern einzusetzen. Des Weiteren erlauben sie die Identifikation von Sämlingen mit pyramidierten Resistenzen, um Genotypen mit erhöhter und dauerhafterer Resistenz gezielt zu selektieren.

Die Untersuchungen erfolgten an einer Nachkommenschaft aus der Kreuzung Gf.Ga-52-42 x 'Solaris' (Abbildung 3). Der Zuchstamm Gf.Ga-52-42 ('Bacchus' x 'Villard blanc') ist aus der Resistenzzüchtung des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof hervorgegangen und

besitzt gute Resistenzeigenschaften gegen den Falschen Mehltau, welche auf den aus den Sorten ‘Regent’ (Fischer *et al.* 2004; Welter *et al.* 2007) und ‘Bianca’ (Bellin *et al.* 2009) bekannten *Plasmopara*-Resistenzlocus *Rpv3* aus amerikanischen Wildarten zurückzuführen ist. Bei ‘Solaris’ (‘Merzling’ x Geisenheim 6493) handelt es sich um eine pilzwiderstandsfähige Ertragsorte, die 1975 am Staatlichen Weinbauinstitut Freiburg gezüchtet wurde (Zuchtstamnummer FR 240-75). Die Sorte zeichnet sich durch eine sehr frühe Reife mit hohen Mostgewichten und eine sehr hohe Festigkeit gegenüber dem Falschen Mehltau aus (Staatliches Weinbauinstitut Freiburg 2007).

Gf.Ga-52-42



(Bild: JKI, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof)

‘Solaris’



(Bild: Staatliches Weinbauinstitut Freiburg)

X

Abbildung 3: Trauben der beiden Kreuzungseltern

Der weibliche Elternteil ‘Merzling’ (‘Seyval’ x (‘Riesling’ x ‘Pinot Gris’)) ist Träger einer bislang nicht charakterisierten *P. viticola* Resistenz amerikanischer Wildarten, welche als „mittel bis hoch“ eingestuft wird (Staatliches Weinbauinstitut Freiburg 2006). Für die Bestäubung von ‘Merzling’ wurde eine Pollenmischung der Kreuzungspopulation Geisenheim 6493 verwendet, die 1963 in der ehemaligen Tschechoslowakei gekreuzt und im Fachgebiet Rebenzüchtung der Forschungsanstalt Geisenheim aufgezogen wurde. Diese Population entstand als Rückkreuzung nach der Introgression eines Genotyps der asiatischen Wildart *Vitis amurensis*, die 1936 in der ehemaligen Sowjetunion durchgeführt wurde (Becker 1981). Die Lokalisierung und Feinkartierung dieser asiatischen Resistenzquelle gegen den Falschen Mehltau bildet den Schwerpunkt der durchgeführten Arbeiten.

2 Material & Methoden

2.1 Material

Geräte	Hersteller/Referenz
ABI 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI 9700 Thermocycler	Applied Biosystems, Darmstadt
Feinwaage MC BA 100	Sartorius, Göttingen
Gefriertrocknung Beta 1102	Christ, Osterode
Gelelektrophorese EC360M mit EC105	Thermo Scientific, Dreieich
Handstanze	Harris Uni-Core
HPLC-System: P680, ASI-100 und PDA-100 mit den Säulen LiChrCART [®] 4-4 und 250-4	Dionex, Olten, CH Merck, Darmstadt
Kugelmühle Tissue Lyser	Qiagen, Hilden
Liquidator ⁹⁶	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach
NanoPhotometer	Implen, München
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pipettierroboter FasTrans	AnalytikJena, Jena
Fluoreszenzmikroskop DM4000B	Leica, Wetzlar
Stereomikroskop MZ16 mit Kamera DFC420C	Leica, Wetzlar
Vortex-Genie2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage Precision Advanced	Ohaus, Florham, NY, USA
Zentrifuge 2K15	Sigma, Osterode am Harz
Zentrifuge 4K15	Sigma, Osterode am Harz
Zentrifuge Z160M	Hermle, Wehingen

Bioinformatische Software	Hersteller/Referenz
Chromelon 6.80SP3	Dionex, Olten, CH
Join Map 4	Kyazma, Wageningen, Niederlande
Gene Mapper 4.0	Applied Biosystems, Darmstadt
Map QTL 5 und 6	Kyazma, Wageningen, Niederlande
WebSat (http://wsmartins.net/websat/)	(Martins <i>et al.</i> 2009)
BioEdit 7	Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA
MapChart 2.2	(Voorrips 2002)
R (Statistik Software)	(R Development Core Team 2011)

Chemikalien/Verbrauchsmaterial	Hersteller/Referenz
Acetonitril (Best.Nr.: 1.00030.2500)	Merck, Darmstadt
Agarose LE	Biozym, Hess. Oldendorf
Anilinblau, wasserlöslich (Art. 1275, Lot. 31525)	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	BD, Heidelberg
Biologische Testschalen (23x23x2,5 cm)	Nunc, Fisher Scientific, Schwerte
96er Deepwell-Platten	ABgene, Epsom, UK
Methanol (Best.Nr.: 1.06007.2500)	Merck, Darmstadt
Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
NaHCO ₃ (Best.Nr.: 1.06580.1000)	Merck, Darmstadt
96/384er PCR-Platten	Eppendorf, Hamburg Kisker Biotech, Steinfurt
Primersynthese inkl. 5'-Label	Metabion, Planegg-Martinsried
0,2, 0,5, 1,5 und 2,0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

2.1.1 Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen wurden an einer Nachkommenschaft aus der Kreuzung zwischen dem Zuchtstamm Gf.Ga-52-42 ('Bacchus' x 'Villard blanc') und der Sorte 'Solaris' ('Merzling' x Geisenheim 6493) durchgeführt. Die Kreuzung erfolgte 2008. Im Frühjahr 2009 wurde die Population im Gewächshaus angezogen und 265 Pflanzen wurden verwendet, um von ihnen phänotypische und genetische Daten zu erheben.

Da die durchgeführte Kreuzung im Jahr 2008 sehr erfolgreich gewesen war und eine hohe Anzahl an Samen hervorgebracht hatte, waren im Frühjahr 2010 weitere 2700 Pflanzen angezogen worden um die Population für eine Locus-spezifische Feinkartierung erweitern zu können. Nach der Anzucht wurden die Sämlinge in 96er-Pflanzschalen vereinzelt und die Keimblätter beprobt.

2.1.2 *Plasmopara viticola*-Sporenmaterail

Verwendet wurde Sporenmaterail von Blättern unterschiedlicher Rebsorten ohne Fungizid-behandlungen mit natürlicher *P. viticola*-Infektion („Ölflecken“). Die Sporangiensuspension wurde durch das Abpinseln der Sporangienträger von Blättern mit frischem Infektionsausbruch hergestellt. Dazu wurden diese am Tag vor dem Experiment gesammelt und in einer mit nassen Tüchern ausgekleideten Kunststoffüte über Nacht inkubiert.

2.1.3 Genetische Ressourcen

Die DNA der untersuchten Rebsorten und Zuchtstämme wurde von Pflanzen aus der am Institut angesiedelten, zur „Deutschen Genbank Reben“ gehörenden (<http://www.deutsche-genbank-reben.jki.bund.de/>), Rebsortensammlung gewonnen.

2.2 Methoden

2.2.1 Ermittlung der Plasmopara-Resistenz durch Blattscheibentests

Die phänotypische Bewertung der Resistenz erfolgte über Blattscheibentests. Mit dieser Methode lässt sich die Blattresistenz nach künstlicher Infektion mit *P. viticola* unter kontrollierten Bedingungen ermitteln. Um ein einheitliches physiologisches Blattstadium zu untersuchen, wurden je Genotyp das dritte und vierte Blatt basipetal von der Triebspitze verwendet, um daraus Blattscheiben zu stanzen. Dies erfolgte mit einem Korkborer aus Edelstahl mit 18 mm Durchmesser. Vier Blattscheiben je Genotyp wurden mit der Blattunterseite nach oben in 23x23 cm große biologische Testschalen (Nunc, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) mit 0,8 %igem Wasseragar (BD, Heidelberg) gelegt. Die künstliche Infektion mit *P. viticola* erfolgte durch Auftropfen von 40 µl Sporangiensuspension mit etwa 20.000 Sporangien pro Milliliter. Die Sporangienkonzentration wurde mit der Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt und die Suspension vor der Verwendung entsprechend mit Wasser verdünnt. Die Blattscheiben mit der aufgetropften Sporangiensuspension wurden über Nacht bei 25 °C inkubiert und die Suspension am nächsten Tag mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die weitere Inkubation erfolgte für 5 bis 7 Tage in der Klimakammer mit einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus und hoher relativer Luftfeuchte (>95 %).

Die Resistenzausprägung der einzelnen Individuen in der Population wurde in vier voneinander unabhängigen Blattscheibentests erhoben. Die Experimente wurden im Juli, August und September 2009 sowie im Mai 2010 durchgeführt.

Die Bewertung erfolgte anhand der Anzahl gebildeter Sporangienträger die unter dem Stereomikroskop bei 10facher Vergrößerung ermittelt wurde. Die Einteilung erfolgte analog zum Deskriptor Nr. 452-1 der OIV (International Organisation of Vine and Wine, <http://www.oiv.int>) in fünf Klassen (9: keine, 7:eins bis fünf, 5: sechs bis zwanzig, 3: mehr als zwanzig Sporangienträger, 1: dichter Sporangienträger Teppich). Abbildung 4 zeigt beispielhaft Blattscheiben der Boniturklassen 1, 5 und 9. Mit der gewählten Einteilung erhält man eine stringente Resistenzbewertung in den oberen Resistenzklassen. Sowohl die Daten

der Einzelexperimente (Mittelwert der vier Blattscheiben je Genotyp) als auch der Mittelwert aus allen Ergebnissen der vier Blattscheibentests wurden für die QTL-Analysen verwendet.



Abbildung 4: Beispiele für infizierte Blattscheiben der Boniturnoten 1, 5 und 9 (von links nach rechts; 2,5-fach vergrößerte Darstellung).

2.2.2 Stilben-Analyse mittels HPLC

Künstlich infiziertes Blattmaterial der Kreuzungspopulation wurde verwendet um die Konzentration mehrerer Stilbene 72 h nach einer *Plasmopara*-Infektion zu bestimmen. In den Untersuchungen von Pezet *et al.* (2004a) waren zu diesem Zeitpunkt die höchsten Stilbenkonzentrationen gemessen worden. Dazu wurden pro Pflanze je fünf Blattscheiben verwendet, um aus diesen den infizierten Bereich mit einem Skalpell auszuschneiden und ihn in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß zu überführen. Das Blattfrischgewicht der Probe wurde über eine Feinwaage bestimmt und die Proben anschließend bei -70°C eingefroren. Die Extraktion und Analyse der Stilbene aus den Proben erfolgte am Agroscope Changins-Wädenswill (ACW) in Changins (Schweiz) in der Arbeitsgruppe Mykologie unter der Leitung von Dr. Katia Gindro mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, „high performance liquid chromatography“). Die Stilbene wurden nach der von Gindro *et al.* (2006) veröffentlichten Methode mittels Methanol aus den Proben extrahiert und wie von Pezet *et al.* (2003) beschrieben aufgetrennt. Die Steuerung und Auswertung erfolgten über das Programm Chromelon V6.80 (Dionex).

2.2.3 Kallose-Nachweis

Kallose lässt sich spezifisch mit Anilinblau anfärben. Dazu wurde analog zu Gindro *et al.* (2003) das infizierte Blattstück mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und für eine Minute in eine wässrige Lösung aus 0,2 % Anilinblau in 5 % Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) gegeben. Die Probe wurde anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM4000B mit Filtersatz A) betrachtet.

2.2.4 DNA-Extraktion

Etwa 1 cm² Blattmaterial des dritten Blattes eines Triebes wurde für die Extraktion der genomischen DNA verwendet. Diese wurden in vorgekühlten 96er Deepwell-Platten (ABgene, Epson, UK) gesammelt und lyophilisiert (Christ, Osterode). Das Blattmaterial wurde in einer Kugelmühle (Qiagen, Hilden) zerkleinert und die DNA mit dem DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen, Hilden) nach Handbuch oder alternativ nach Lemke *et al.* (2011) extrahiert. Weitere Extraktionen von Einzelproben wurden mit dem DNeasy Plant Mini oder Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach Handbuch durchgeführt. Die Menge und Reinheit der extrahierten DNA wurde auf dem Agarosegel und spektralphotometrisch (NanoPhotometer, Implen, München) bestimmt.

Die DNA-Extraktion der zusätzlichen 2700 Pflanzen der Kreuzungspopulation wurde anhand der einfachen DNA-Extraktionsmethode von Wang *et al.* (1993) etabliert. Hierfür wurden aus den Keimblättern junger Sämlinge Stücke mit 3 mm Durchmesser gestanzt (Handstanze von Harris Uni-Core). Diese wurden in 96er-PCR-Platten auf Trockeneis gesammelt und anschließend bei -80°C eingefroren. Zur Extraktion wurden je Vertiefung 20 µl einer 0,5 N NaOH-Lösung zugegeben und gut gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt (6000 rpm, 2 min) wurden 4 µl des Überstandes in 46 µl 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 überführt und gemischt.

2.2.5 SSR-Marker

Die Auswahl der verwendeten SSR-Marker erfolgte aus veröffentlichten Kartierungsarbeiten (Adam-Blondon *et al.* 2004; Bowers *et al.* 1999; Bowers *et al.* 1996; Cipriani *et al.* 2008; Di Gaspero *et al.* 2007; Di Gaspero *et al.* 2005; Di Gaspero *et al.* 2011; Doligez *et al.* 2006; Merdinoglu *et al.* 2005; Salmaso *et al.* 2008; Scott *et al.* 2000; Thomas & Scott 1993; Welter *et al.* 2007) nach Kartierungshäufigkeit, Lokalisation auf den Kopplungsgruppen und den benötigten PCR-Bedingungen. Diese Marker wurden auf ihre Funktionalität im gewählten Standard-PCR-Programm, auf ihre Multiplex-Tauglichkeit und ihr Segregationsmuster hin

getestet. Marker, die sich für die weitere Analyse als geeignet zeigten, wurden in Multiplex-Sets mit bis zu 12 Markern kombiniert. Diese Sets wurden an einem kleinen Satz an Individuen, den Eltern und einer Negativkontrolle getestet. Erfolgreich getestete Multiplex-Sets wurden auf die 265 Individuen umfassende Population und ausgewählte Sorten aus deren Stammbaum angewendet.

Des Weiteren wurden neu entwickelte Marker verwendet, welche mit Hilfe der Software „WebSat“ (Martins *et al.* 2009) vom Reben-Referenzgenom PN40024 (Jaillon *et al.* 2007) abgeleitet wurden. Diese wurden einheitlich mit dem Kürzel „GF“ für Geilweilerhof, einer zweistelligen Zahl für das Chromosom und einer mit einem Bindestrich abgetrennten zweistelligen laufenden Nummer (z.B. GF01-03) benannt. Ein Teil der in der vorgestellten Kartierung verwendeten Marker wurden im Rahmen des Forschungsprojektes „GrapeReSeq“ entwickelt (Fechter *et al.* in Vorbereitung). Weitere Marker, insbesondere im Bereich der Resistenzloci, wurden speziell für diese Kartierung entwickelt und sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Für die Feinkartierung entwickelte und kartierte SSR-Marker.

Marker-name	forward Primer	reverse Primer	Fragmentgröße ^a	SSR-Motiv ^a	Phys. Position (bp) ^a	Segregationsstyp ^b
GF09-13	TCTTGCTCACATGGATATTGA	TGAGCATTAACTTGCAGAGGAG	400	(CT) ₉	1.923.329	<lmxl>
GF09-14	GCAGGTGACAAGCAAGATAAGA	GCTCTGACCTCTTCTATAITCCA	366	(TC) ₉ (TA) ₆ (AG) ₁₆	2.454.185	<abxcd>
GF09-16	ATACCCAACGGAGACAAAGAGTG	AAGAACAACAAAGAAAGTGGGCTG	230	(GA) ₉	5.920.527	<nnxnp>
GF09-19	TGAAGCCACAGAAAAGAAAGATG	TTGATTGGAGTGGATGTCGTAG	322	(GA) ₁₁	13.305.311	<nnxnp> & <lmxl>
GF09-24	CGGTCAACGAGAAATAAAGGTC	CGATCCAGAGGGTAGGAGTTTA	372	(ATA) ₇	2.657.254	<abxcd>
GF09-27	TTAACGGGGAACAACTAACAG	TCTCTCTCTTGGTCAACTTCC	381	(AAG) ₆	2.723.684	<nnxnp> & <lmxl>
GF09-29	CAGCCCTTAGCATTTCCAAATTA	CCGGTTCCTCAACCAAACTTTT	329	(ATT) ₈	2.731.717	<efxeg>
GF09-42	CATAGCTCTTACATGGACCAA	GTGGGAAAACGCATTCGAG	419	(AAT) ₁₁ (ATT) ₆	2.995.592	<lmxl>
GF09-43	GGCCTTACAGTCTGTATTTGGAT	CACAGGCTTGATATTGCACATT	444	(AT) ₂₀	3.147.101	<efxeg>
GF09-44	CATCGTTCCTTTCTTACTCGCT	GCTAATGGAGGGTAGTGCTCAA	231	(AG) ₈	3.388.801	<efxeg>
GF09-45	CAC TTCGTTGAGAAAAGCATCA	GAAGAAGATGGTGGTGGGATAG	219	(AG) ₉	3.564.900	<nnxnp>
GF09-46	GAGAGATTGAGGGATTGTTGG	ATCCACGTTTGTAGCCTTTTGT	424	(GA) ₁₇	3.666.103	<efxeg>
GF09-47	CCACATTCCTCTGCACATAAA	CTGTTGTAAGGGCTCCCAATTA	295	(GAT) ₇	3.703.008	<nnxnp>
GF09-48	TCTGGAAAGCACAGTAGAGAAGTG	ATGGAAGGAACCAATGCTAAGA	346	(TC) ₁₀ (CA) ₆	3.854.406	<nnxnp>
GF09-52	TGGAAGAACAAGAGGGATCAIT	CTCACAGTCAAAACCCAAAACA	387	(TCT) ₇	4.965.413	<nnxnp>
GF09-53	CATTATCACCTTCATGGCTTCA	TGAAATCTAGTGGGCTTGACCT	367	(AATA) ₆	5.292.317	<lmxl>
GF09-54	TTTGGCAGTCAAGAACTGGATA	AATGAATATAGCTGGACCCGAC	275	(CTC) ₆	4.391.859	<lmxl>
GF09-55	ACTCTCTGTGATTTAAGGACGA	CAGGTTACAGGTAGCAGGTGAT	260	(TC) ₁₄	4.406.559	<efxeg>
GF09-57	CCCTTCCTTTGCTAACTCCCT	GGGTTCTGTGATGAAITTGCTTTA	356	(CT) ₆ (TC) ₉ (CT) ₆ (CT) ₁₄ (AC) ₇	5.053.223	<efxeg>
GF09-61	CAATTTATGTGCTCCAACCCCTT	ATCTTCCAATTCATGCCAGTT	411	(TCC) ₆	3.476.887	<efxeg>
GF09-62	TCAGGTGGGTAGTCTTGGGTAT	TCTACAAAGGGTATCGGCTAA	389	(AT) ₇	3.498.499	<efxeg>
GF09-65	ATCCAAAAGTGATTGGCTCAAGT	ATTCGTCCATATCCACAACCTC	314	(AT) ₉	3.624.190	<nnxnp>

^aFragmentgröße, SSR-Motive und physikalische Position im 12x PN40024 Referenzgenom. ^bSegregationsstyp in der Kreuzungspopulation GfGa-52-42 x 'Solaris' (entsprechend *Tabelle 4*)

2.2.6 Polymerasekettenreaktion und Fragmentlängenanalyse

Um die Marker zu amplifizieren wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) in einem Multiplexverfahren eingesetzt. Dazu wurde das Qiagen Multiplex-PCR-Kit (Qiagen, Hilden) genutzt. In 10 µl Reaktionsansätzen wurden 1,5 bis 5 pmol jedes Primers und etwa 3 ng template DNA zusammen mit dem Qiagen Multiplex 2x PCR Mix eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in ABI 9700 Thermocyclern (Applied Biosystems, Darmstadt). Zur Aktivierung der HotStar*Taq* DNA Polymerase wurde eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 15 min durchgeführt. Es folgten 30 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Primerannealing bei 60 °C für 90 sec und einer Elongation bei 72 °C für 60 sec. Die abschließende Elongation betrug 20 min bei 72°C. Für die Proben aus der schnellen DNA-Extraktionsmethode wurden 1 µl der DNA-haltigen Lösung eingesetzt und die Anzahl der Zyklen auf 35 erhöht.

Die Fragmentlängen der PCR-Produkte (1 µl je Probe) wurden mit einem 16-Kapillar-Sequenzier (ABI 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Darmstadt) ermittelt. Für die automatische Detektion war ein Primer jedes SSR-Markers am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (6-FAM, HEX, TAMRA oder ROX) markiert (Primersynthese und Markierung durch Metabion, Planegg-Martinsried). Als Größenmarker wurde ein am Institut hergestellter Größenmarker mit BODIPY 639/650-Markierung, der einen Bereich von 35 bis 500 bp abdeckt, verwandt. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, Darmstadt) ausgewertet.

2.2.7 Erstellen der genetischen Karten

Das Programm JoinMap 4.0 (Van Ooijen 2006) wurde verwendet um anhand der Daten eine mütterliche und eine väterliche, sowie eine integrierte genetische Karte zu erstellen. Entsprechend des Segregationsmusters wurden die Genotypen nach den Vorgaben im Handbuch codiert (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Mögliche Segregationsmuster und Genotypen in einer Kreuzungspopulation

Segregation	Beschreibung	Genotypen			
<abxcd>	Heterozygot in beiden Eltern mit vier Allelen	ac	ad	bc	bd
<efxeg>	Heterozygot in beiden Eltern mit drei Allelen	ee	ef	eg	fg
<hxxhk>	Heterozygot in beiden Eltern mit zwei Allelen	hh	hk	kk	
<lmxll>	Heterozygot im ersten Elternteil (Mutter)	ll	lm		
<nnxnp>	Heterozygot im zweiten Elternteil (Vater)	nn	np		

Die Konstruktion der Karten erfolgte unter Verwendung der „Double Pseudo-Testcross“-Strategie (Grattapaglia & Sederoff 1994). Für die Gruppierung der Marker wurde der „independence LOD score“, welcher auf dem G^2 -Test, einer Form des Likelihood-Ratio-Tests, beruht, verwendet. Die Nummerierung der Kopplungsgruppen erfolgte nach Adam-Blondon *et al.* (2004) gemäß der Empfehlung des IGGP („International Grape Genome Program“; <http://www.vitaceae.org>).

Eine Abschätzung der Genomlängen erfolgte nach der Berechnungsmethode von Hulbert *et al.* (1988). In die Formel $E(G) = M(M-1)X/K$ fließen die Markeranzahl (M), die maximale Distanz zwischen zwei Markern (X) und die Anzahl an Locuspaaren oberhalb der LOD Signifikanzgrenze (K) ein.

2.2.8 QTL-Analysen

Die Analyse der Quantitative Trait Loci (QTL) wurde mit dem Programm MapQTL in den Versionen 5 bzw. 6 (Van Ooijen 2009) durchgeführt. Intervall Mapping (IM) und Multiples QTL Mapping (MQM) wurden verwendet, um merkmalsrelevante Genomabschnitte statistisch zu ermitteln. Dafür wurden Schrittweiten von 0,5, später von 0,1 cM gewählt und nah am QTL liegende Marker als Cofaktoren für die MQM-Analysen verwandt. Die Berechnungen wurden sowohl an den elterlichen Karten, als auch an der integrierten Karte durchgeführt. Die Signifikanzgrenzen bei $\alpha = 0.05$ (5 %) wurde mit mindestens 1000 Permutationen bestimmt. Die graphische Darstellung der QTLs erfolgte mit dem Programm MapChart 2.2 (Voorrips 2002)

2.2.9 Statistische Tests auf Normalverteilung

Die statistische Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte mit der Statistiksoftware R (R Development Core Team 2011). Dafür wurden Tests aus den Paketen ‘nortest’ (Groß 2006), ‘tseries’ (Trapletti & Hornik 2011) und dem Standardpaket ‘stats’ verwandt.

2.2.10 Abgleich mit den Genomsequenzen

Die beim Grape Genome Browser“ (<http://www.genoscope.cns.fr/Vitis>) hinterlegte Referenzgenomsequenz des ‘Pinot Noir’-Inzuchtgenotyps PN40024 (Jaillon *et al.* 2007) mit der verknüpften „Genewise Uniprot“ Datenbank (<http://www.uniprot.org>) wurde genutzt, um annotierte Gene im *Rpv10*-Locusbereich zu identifizieren.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypisierung der *Plasmopara*-Resistenz

Die Lokalisierung von Resistenzregionen in einer Kreuzungspopulation setzt zuverlässige phänotypische Daten über die Resistenzausprägung voraus. Für den Falschen Mehltau lässt sich die Stärke des Befalls effektiv durch Blattscheibentests ermitteln. Die Resistenzbewertung für die Individuen der Kreuzungspopulation erfolgte anhand der Anzahl an gebildeten Sporangienträgern. Je weniger Sporangienträger das Individuum im Mittel aufwies, desto höher wurde seine Resistenzausprägung beurteilt. Die Bewertung der gebildeten Sporangienträger lässt Rückschlüsse auf die Fähigkeit des Pathogens zu, ein Blatt zu infizieren, zu besiedeln und neue Sporangien für eine weitere Ausbreitung zu bilden und somit den kompletten asexuellen Vermehrungszyklus zu durchlaufen. Gelingt es der Pflanze in einem der Stadien, die Pathogenentwicklung zu unterbrechen, resultiert dies in einer Reduktion oder dem Ausbleiben der Sporangienträgerbildung.

Die Verteilung der Resistenzausprägung gegen den Falschen Mehltau in der untersuchten Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x ‘Solaris’ ist im Histogramm der Abbildung 5 dargestellt.

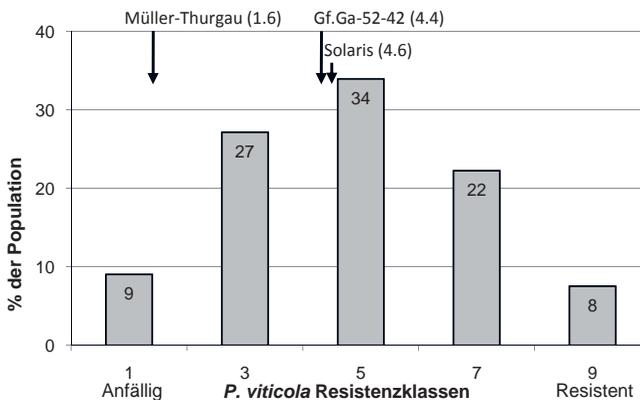


Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung der *Plasmopara viticola* Resistenzklassen (9: keine Sporangienträger, 7: eins bis fünf, 5: sechs bis zwanzig, 3: mehr als zwanzig Sporangienträger, 1: dichter Sporangienträger-teppich) in der Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x ‘Solaris’. Die Daten basieren auf dem Mittelwert aus vier unabhängigen Bonituren mit je vier Blattscheiben während der Vegetationsperioden 2009 und 2010 an 265 Individuen. Die Pfeile geben die Resistenzbewertungen der Kreuzungseltern sowie der anfälligen Vergleichssorte ‘Müller-Thurgau’ an (Schwander *et al.* 2011).

Für jedes Individuum der Kreuzungspopulation wurde der Mittelwert von vier unabhängig durchgeführten Blattscheibentests mit je vier Blattscheiben in den Jahren 2009 und 2010 berechnet. Entsprechend dieser Mittelwerte wurden die 265 untersuchten Individuen der Kreuzungspopulation in die Resistenzklassen 1 (anfällig) bis 9 (resistent) eingeteilt.

Die Verteilung der Daten im Histogramm entspricht annähernd einer Normalverteilung mit einem Anteil von 8 % hoch resistenten und 9 % stark anfälligen Pflanzen. In Abbildung 5 wurden zudem die Mittelwerte der Resistenzausprägungen bei den Kreuzungseltern durch Pfeile gekennzeichnet (Gf.Ga-52-42: 4.4, 'Solaris': 4.6). Auffällig dabei ist, dass 30 % der Nachkommen in die deutlich höheren Resistenzklassen 7 und 9 eingeordnet wurden. Die *V. vinifera*-Sorte 'Müller-Thurgau' wurde als anfällige Referenzsorte im Blattscheibentest verwendet und zeigte erwartungsgemäß hohe Sporulationsraten.

Zur graphischen Überprüfung der Resistenzverteilung in der Kreuzungspopulation wurden neben dem Histogramm zwei weitere Darstellungsformen gewählt (Abbildung 6).

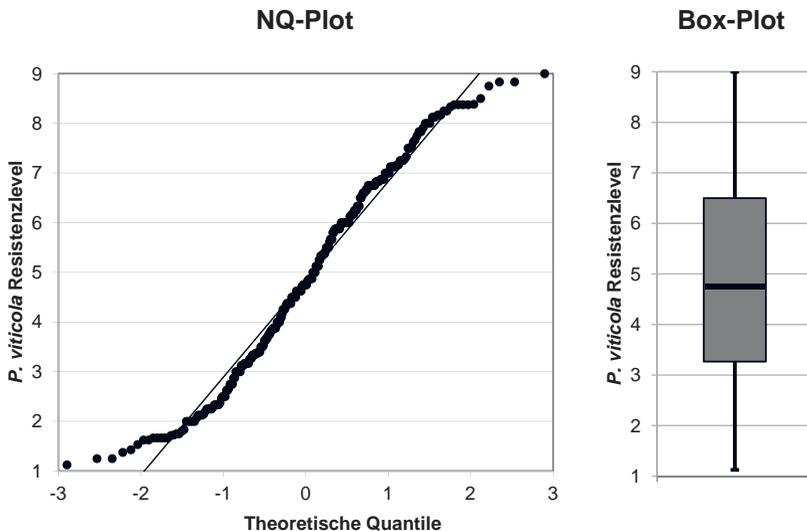


Abbildung 6: Graphische Überprüfung des phänotypischen Datensatzes auf Normalverteilung mit NQ- und Box-Plot. Beim NQ-Plot sind die erhobenen Daten gegen die erwarteten Daten einer Normalverteilung aufgetragen. Für einen normalverteilten Datensatz ist dabei ein linearer Verlauf zu erwarten. Der Box-Plot zeigt, dass eine symmetrische Verteilung im Datensatz vorliegt.

Der Normal-Quantil-(NQ)-Plot kann dazu verwendet werden, die erhobenen Werte mit den für eine Normalverteilung erwarteten Werten zu vergleichen. Ein linearer Verlauf der Werte

spricht dabei für eine Normalverteilung. Die Beobachtung in Abbildung 6 zeigt, dass besonders der mittlere Bereich einer Normalverteilung nahe kommt, in den Randbereichen kommt es bei einzelnen Werten jedoch zu deutlichen Abweichungen. Im Box-Plot (oder Box-Whisker-Plot) sind der Median $Z=4,8$ (schwarzer waagrechter Balken), die oberen und unteren Quartile ($Q_3=6,5$; $Q_2=3,2$, obere und untere Grenze der Box) sowie die „Whisker“ als 1,5-facher Vertrauensbereich ($(Z-Q_1)$ bzw. (Q_3-Z)) angegeben. Die Box enthält dabei 50% der erhobenen Messdaten. Mit dieser Darstellung lässt sich feststellen, dass die Verteilung der Resistenzlevel in der Kreuzungspopulation weitgehend symmetrisch ist (Z mittig zwischen Q_3 und Q_2), was die Annahme einer Normalverteilung unterstützt.

Zudem wurden statistische Tests auf das Vorliegen einer Normalverteilung durchgeführt (Tabelle 5). Die Berechnungen erfolgten mit der Statistiksoftware R. Dabei konnte nur für den Kolmorov-Smirnov Test auf Normalverteilung kein signifikanter Unterschied zwischen dem Datensatz und einer Normalverteilung festgestellt werden. Die übrigen Testverfahren, welche eine höhere Güte (geringer Fehler 2. Art) aufweisen, zeigten mit p-Werten unter 0,05, dass der Datensatz signifikant von der einer Normal-

Tabelle 5: Tests der phänotypischen Resistenzdaten auf Normalverteilung.

Test auf Normalverteilung	P-Wert
Shapiro-Wilk	$4,965 \times 10^{-05}$
Pearson chi-square	0,0001855
Shapiro-Francia	0,0003197
Cramer-von-Mises	0,001986
Anderson-Darling	0,00252
Jarque-Berea	0,004081
Lilliefors	0,01035
Kolmorov-Smirnov	0,2259

verteilung abweicht. Zusammen mit den graphischen Beobachtungen zeigt dies, dass der Datensatz keine optimale Normalverteilung aufweist, ihr jedoch sehr nahe kommt.

Für die Blattscheibentests wurde Gewächshausmaterial verwendet. Dadurch konnten Umwelteinflüsse, die sich bei Freilandmaterial auf die Resistenzausprägung auswirken könnten, reduziert werden. Hierbei spielt die bei ‘Solaris’ unter Freilandbedingungen beobachtete, stark ausgeprägte hydrophobe Behaarung (Trichome) der Blattunterseite sicherlich eine große Rolle. Diese bildet eine nahezu wasserundurchlässige Barriere, welche eine Benetzung der unteren Epidermis, in der sich die Stomata befinden, effektiv verhindern kann. Die Zoosporen von *P. viticola* sind auf einen Wasserfilm angewiesenen, um die Stomata zu erreichen und durch diese das Blatt erfolgreich infizieren zu können. Da eine dichte Behaarung den Kontakt zwischen Wasser und Stomata verhindert, wird die Wahrscheinlichkeit einer Infektion deutlich reduziert. Dies konnte elektronenmikroskopisch von Kortekamp & Zyprian (1999) dokumentiert werden und scheint ein essentieller Resistenzfaktor für die beobachtete Feld-

resistenz der Wildarten *V. davidii* und *V. doaniana* zu sein. Ein weiterer Effekt ergibt sich dadurch, dass die Blattunterseite durch das ABERLEN von Wassertropfen schneller abtrocknet, wodurch auch die Zeitspanne für eine Infektion deutlich reduziert wird. Abbildung 7 zeigt den Effekt der hydrophoben Blattbehaarung am Beispiel der beiden Elternpflanzen der Kreuzungspopulation. Diese bei Freilandmaterial auftretende präformierte Resistenzbarriere konnte bei dem verwendeten Gewächshausmaterial nicht beobachtet werden. Zwar gab es auch Genotypen, die unter den Gewächshausbedingungen Trichome aufwiesen, jedoch war deren Anzahl viel zu gering, um eine Behaarung auszubilden, die dicht genug war, um eine Benetzung der Epidermis mit der Sporangiensuspension zu verhindern. Aufgrund der schwachen Ausprägung dieses Merkmals konnte die Variation in der Population am vorliegenden Pflanzenmaterial nicht erhoben werden. Die Verwendung von Gewächshausmaterial erlaubte damit aber eine gezieltere Erfassung der genetischen Resistenzeigenschaften.

Benetzbarkeit der Blattunterseite

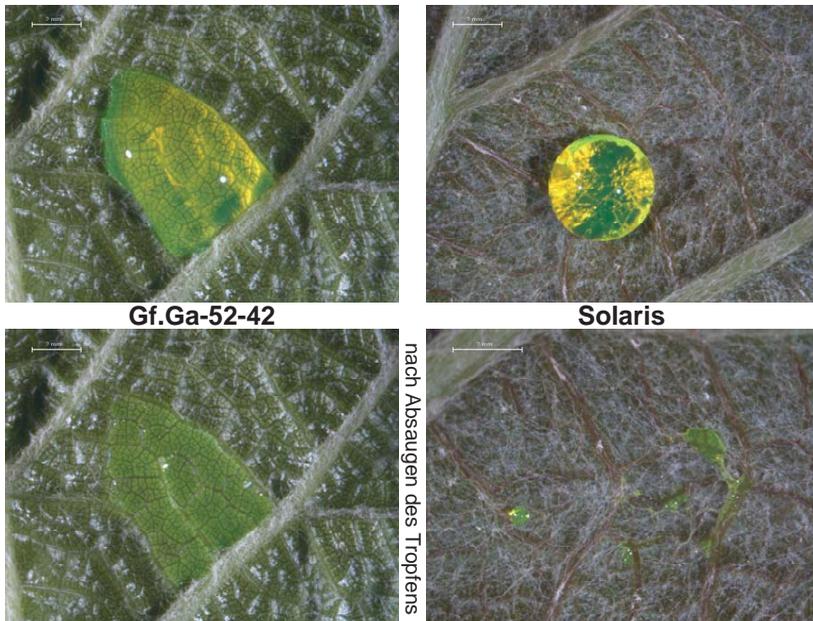


Abbildung 7: Benetzbarkeit der Blattunterseite (Freilandmaterial) von Gf.Ga-52-42 und 'Solaris'. Bei Gf.Ga-52-42 kommt es zu einer fast vollständigen Benetzung (links oben), wodurch sich das mit Fluorescein versetzte Wasser nicht vollständig entfernen lässt (links unten). Auf 'Solaris' verhindert die dichte hydrophobe Behaarung ein Benetzung der unteren Blattoberfläche (rechts oben). Dies ermöglicht ein fast vollständiges Entfernen des Tropfen (rechts unten). Größenbalken entspricht 2 mm.

3.2 Stilben-Analyse

Die Stilbene Resveratrol, Pterostilben, sowie ϵ - und δ -Viniferin haben zum Teil bereits bei geringen Konzentrationen eine toxische Wirkung auf *P. viticola* (Pezet *et al.* 2004a). Bei Infektionsversuchen an ‘Solaris’ war ein schneller Anstieg der Konzentrationen von Resveratrol, ϵ - und δ -Viniferin beobachtet worden, die innerhalb von 48 bzw. 72 h nach der Infektion Werte weit über der Toxizitätsgrenze erreichten (Pezet *et al.* 2004b). Die Analyse der Proben erfolgte an dem am Agroscope Changins-Wädenswil etablierten System. Dabei wurden die Stilbene aus 246 Proben der Kreuzungspopulation extrahiert und mittels HPLC analysiert. Somit ließen sich die Konzentration in $\mu\text{mol pro mg}$ Frischgewicht der Stilbene Piceid, Resveratrol, Pterostilben, ϵ - und δ -Viniferin sowohl in der trans- als auch in der cis-Konformation bestimmen. Die Konzentrationen der einzelnen Stilbene wurden mit dem Resistenzniveau der untersuchten Pflanze verglichen. Dabei konnte keine lineare Korrelation zwischen der jeweiligen Stilbenkonzentration und dem Resistenzniveau festgestellt werden. Dies wird an den Korrelationskoeffizienten in Tabelle 6 ersichtlich, welche mit Werten nahe Null das Fehlen eines linearen Zusammenhangs anzeigen. Jedoch ließen sich Beziehungen zwischen Resveratrol und ϵ -Viniferin (Korrelationskoeffizient 0,5878), Resveratrol und δ -Viniferin (0,5917), sowie zwischen ϵ - und δ -Viniferin (0,8454) feststellen. Dies lässt sich durch den Syntheseweg erklären, bei dem die Viniferine über eine Oxidation durch Peroxidasen aus Resveratrol synthetisiert werden (Pezet *et al.* 2004b).

Da im Gegensatz zu den Literaturangaben (Gindro *et al.* 2006; Pezet *et al.* 2004b) keine Korrelation zwischen den Stilbenen und der Resistenzausprägung nachgewiesen werden konnte, wurde auf Wiederholungen der Analyse verzichtet. Insgesamt waren die Stilbenkonzentrationen auch deutlich geringer, als die von Pezet *et al.* (2004a) dargestellten Werte für ‘Solaris’. Die vorliegenden Daten wurden dennoch in einer QTL-Analyse mit der genetischen Karte verrechnet. Dabei konnten für die meisten Stilbene auch QTL ermittelt werden. Diese beruhen jedoch ausschließlich auf einem phänotypischen Datenpunkt und sind damit nicht abgesichert.

Tabelle 6: Korrelationskoeffizienten zwischen dem *Plasmopara*-Resistenzniveau und den analysierten Stilbenen.

	Korrelation zum Resistenzniveau
tr-Piceid	0,0134
cis-Piceid	-0,1079
tr-Resveratrol	-0,1245
cis-Resveratrol	0,0724
cis- ϵ -Viniferin	0,0366
tr- ϵ -Viniferin	-0,0592
tr- δ -Viniferin	-0,0736
cis- δ -Viniferin	0,0005
tr-Pterostilben	0,0161
cis-Pterostilben	-0,1093
Piceid (gesamt)	-0,0346
Resveratrol (gesamt)	-0,1192
ϵ -Viniferin (gesamt)	-0,0580
δ -Viniferin (gesamt)	-0,0459
Pterostilben (gesamt)	0,0119
Stilbene (gesamt)	-0,0848

3.3 Kallose-Nachweis

Beobachtungen von Gindro *et al.* (2003) hatten gezeigt, dass eine *Plasmopara*-Infektion bei ‘Solaris’-Blättern dazu führt, dass die Stomata in der Nähe einer Infektionsstelle mit Kallose verschlossen werden. Dieser Mechanismus kann Sekundärinfektionen durch weitere Zoosporen verhindern. Der einfach durchführbare Kallose-Nachweis mit Anilinblau (Gindro *et al.* 2003; Kortekamp *et al.* 1997) sollte verwendet werden, um dieses Merkmal in der Kreuzungspopulation zu untersuchen. Jedoch konnte dieser Effekt im verwendeten Material nicht beobachtet werden. Auch in den untersuchten Blättern von ‘Solaris’ kam es zu keiner Ablagerung von Kallose.

3.4 Genetische Kartierung

Erste Zielsetzung war die Erstellung einer genetischen Basiskarte mit einer gleichmäßigen Abdeckung von etwa fünf SSR-Markern je Chromosom. Diese wurde verwendet, um in ersten QTL-Analysen mit den bis dahin verfügbaren phänotypischen Daten erste Hinweise auf mögliche Resistenzloci zu erhalten. Damit war die Grundlage geschaffen, weitere Marker gezielt auswählen und entwickeln zu können. Dies erfolgte verstärkt für die Kopplungsgruppe (LG, „linkage group“) 09, nachdem hier in ersten Verrechnungen ein ausgeprägter QTL beobachtet wurde. Zudem wurde die Karte mit randständigen SSR-Markern ergänzt, um eine möglichst umfassende Genomabdeckung zu erzielen. Damit umfasst die finale integrierte Karte 219 SSR-Marker (Abbildung 8, Tabelle 7, detailliertere Abbildungen der LGs in Anhang 1), für die Daten an den 265 Individuen der Kreuzungspopulation erhoben wurden. Dies entspricht 58.035 Datenpunkten. Die Marker decken dabei 1110 cM auf den 19 LGs des Rebengenoms ab. Die Kopplungsgruppen wurden mit LOD-Werten („logarithm of odds“) größer oder gleich 10 voneinander abgegrenzt. Aufgrund der Identifizierung eines starken QTL auf der LG 09 und der deshalb zusätzlich gezielt abgeleiteten Marker besitzt diese mit 48 Markern die höchste Markerdichte. Die LG 17 weist mit sechs Markern die geringste Anzahl an Markern auf.

Die finale mütterliche Karte von Gf.Ga-52-42 umfasst 166 SSR-Marker und weist zwischen 5 und 34 Markern pro LG auf. Dabei bilden die sechs Marker der LG 16 zwei getrennte Gruppen mit vier und zwei Markern (Tabelle 7). Bei der väterlichen ‘Solaris’ Karte (158 Marker) besitzt die LG 09 mit 33 Markern die höchste Abdeckung. Dagegen ist die LG 02 mit vier Markern unterrepräsentiert, während die LG 13 in zwei Gruppen mit drei und fünf Markern geteilt ist (Tabelle 7). Die zu erwartende Genomlänge wurde nach Hulbert *et al.*

(1988) abgeschätzt und beträgt für die integrierte Karte 1015 cM. Damit ist die beobachtete Genomlänge mit 1110 cM größer als dieser geschätzte Wert. Für die elterlichen Karten ergeben sich etwas größere erwartete Genomlängen von 1378 cM in der mütterlichen Gf.Ga-52-42- und 1104 cM in der väterlichen ‘Solaris’-Karte (Tabelle 7).

Tabelle 7: Hauptmerkmale der Kopplungsgruppen (LGs, „linkage groups“) in der integrierten Karte, der mütterlichen Gf.Ga-52-42-Karte sowie der väterlichen Karte von ‘Solaris’.

LGs ^a	Integrierte Karte			Mütterliche Karte von Gf.Ga-52-42			Väterliche Karte von ‘Solaris’		
	Länge (cM)	Anzahl Marker	mittlerer Abstand (cM)	Länge (cM)	Anzahl Marker	mittlerer Abstand (cM)	Länge (cM)	Anzahl Marker	mittlerer Abstand (cM)
1	62.66	14	4.48	68.36	12	5.70	56.48	10	5.65
2	34.35	7	4.91	33.82	5	6.76	31.81	4	7.95
3	51.06	8	6.38	57.37	7	8.20	48.41	5	9.68
4	64.35	7	9.19	48.79	5	9.76	50.64	5	10.13
5	68.18	10	6.82	47.26	7	6.75	64.11	6	10.69
6	48.45	8	6.06	45.56	5	9.11	47.40	6	7.90
7	71.63	10	7.16	78.20	9	8.69	65.24	8	8.15
8	68.54	11	6.23	74.32	7	10.62	60.09	8	7.51
9	57.38	48	1.20	66.64	34	1.96	49.49	33	1.50
10	63.98	8	8.00	62.22	5	12.44	64.28	5	12.86
11	55.32	8	6.92	68.36	7	9.77	46.21	7	6.60
12	60.33	12	5.03	68.85	8	8.61	42.87	9	4.76
13	58.79	13	4.52	59.25	12	4.94	9.26/10.81	3/5	3.48/3.15
14	62.21	10	6.22	71.36	8	8.92	59.18	8	7.40
15	42.07	7	6.01	44.89	6	7.48	31.74	5	6.35
16	54.54	9	6.06	34.11/9.55	4/2	8.53/4.78	40.35	6	6.72
17	48.73	6	8.12	48.08	5	9.62	48.02	6	8.00
18	82.27	14	5.88	23.31	11	2.12	74.98	11	6.82
19	55.20	9	6.13	52.52	7	7.50	40.74	8	5.09
O(G) ^b	1110.05	219	6.07	1062.80	166	7.61	942.12	158	7.02
E(G) ^c	1015.46			1377.71			1103.72		

^aKopplungsgruppen entsprechend den Chromosomen gemäß IPPG („International Grape Genome Program“) Nomenklatur.

^bO(G), beobachtete Genomlänge (Summe der Längen aller Kopplungsgruppen)

^cE(G), geschätzte Genomlänge, berechnet mit $E(G)=M(M-1)X/K$ (Hulbert et al. 1988)

(M=Markeranzahl; X=maximaler Kartierungsabstand; K=Anzahl der Locuspaare über der LOD-Signifikanzschwelle)

Um eine höhere Auflösung für den QTL-Bereich auf der LG 09 zu erhalten wurden gezielt weitere, am Institut vorhandene, SSR-Marker dieser Kopplungsgruppe kartiert. Die weitere, zielgerichtete Eingrenzung des Locus erfolgte über die Neuentwicklung Locus-spezifischer SSR-Marker anhand der PN40024-(12x)-Referenzgenomsequenz (siehe Abschnitt 2.2.5). Dabei wurden in sechs Entwicklungsrunden 43 neue SSR-Marker (mit 5 bis 12 neuen SSR-Markern je Entwicklungsrunde) getestet und die 22 informativen Marker kartiert. Anschließend QTL-Analysen mit den bis dahin vorliegenden phänotypischen Resistenzdaten ergaben reduzierte Konfidenzintervalle und damit die Möglichkeit gezielt weitere SSR-Marker für diesen Abschnitt zu entwickeln. Bei jedem Durchlauf konnte der Locus dabei weiter eingegrenzt werden. Einige dieser Kartierungsschritte sind in Abbildung 9 aufgezeigt. Auffällig dabei ist, dass in der ersten Karte (Abbildung 9a) die resultierende QTL-Region noch nicht erfasst war. Dies lässt sich in Anhang 3a besonders deutlich erkennen, da dort die homologen Marker zwischen den Kartenversionen miteinander verbunden wurden. Abbildung 9b zeigt den Stand der Karte nachdem die verfügbaren, kartierbaren Marker ergänzt worden waren. Anschließend erfolgte die Kartierung der neu entwickelten Locus-spezifischen SSR-Marker. Die Kartenversion wie sie in Schwander *et al.* (2011) veröffentlicht wurde ist in Abbildung 9c dargestellt und Abbildung 9d zeigt den aktuellen Stand der Karte, wie er in Abschnitt 3.5 beschrieben ist.

Als limitierender Faktor für eine weitere Eingrenzung des QTL stellten sich letztlich die in diesem Bereich auf der PN40024-Sequenz verfügbaren SSRs heraus. So wurden Marker für alle innerhalb des Konfidenzintervalls liegenden SSRs des Referenzgenoms entwickelt. Leider waren viele dieser SSRs homozygot oder nicht PCR-fähig und konnten deshalb nicht kartiert werden. Alle neu entwickelten und kartierten SSR-Marker sind in Tabelle 3 im Abschnitt 2.2.5 aufgeführt.

Da die Kreuzung sehr erfolgreich gewesen war und ausreichend Samen zur Verfügung standen wurden nachträglich weitere 2700 Pflanzen angezogen, um die Population für die Feinkartierung erweitern zu können. Den Pflanzen wurden im Keimlingsstadium DNA-Proben entnommen, welche auf Rekombinationen im *Rpv3*- und *Rpv10*-Locusbereich getestet wurden. Dabei konnten 28 Genotypen identifiziert werden, die im Bereich des feinkartierten *Rpv10*-Locus einen Rekombinationspunkt besitzen. Nachdem diese Genotypen ermittelt waren, stellte sich jedoch heraus, dass der limitierende Faktor für die Feinkartierung die zur Verfügung stehenden SSR-Marker und nicht die Rekombinationspunkte darstellten. Aus diesem Grund wurden diese Genotypen nicht weiter phänotypisch charakterisiert.

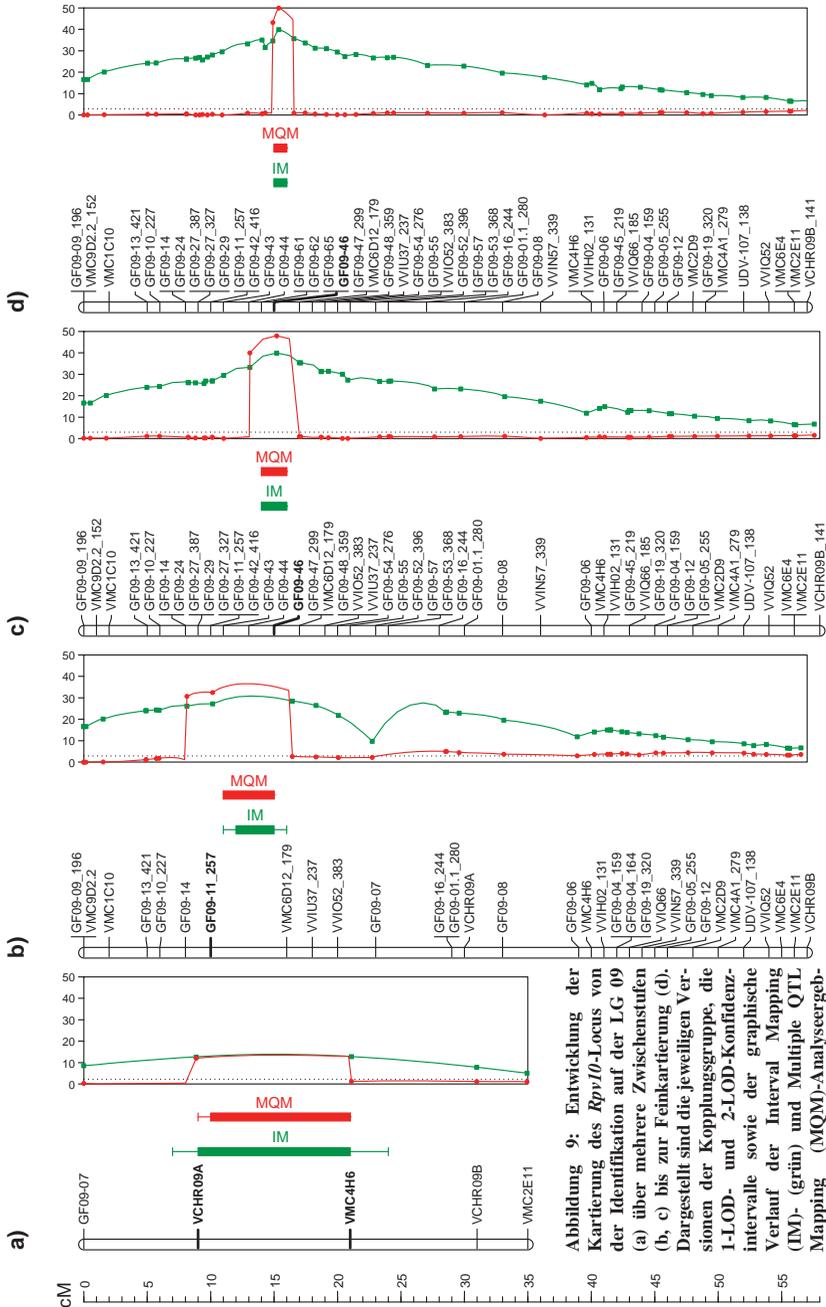


Abbildung 9: Entwicklung der Kartierung des *Rpy10*-Locus von der Identifikation auf der LG 09 (a) über mehrere Zwischenstufen (b, c) bis zur Feinkartierung (d). Dargestellt sind die jeweiligen Versionen der Kopplungsgruppe, die I-LOD- und 2-LOD-Konfidenzintervalle sowie der graphische Verlauf der Interval Mapping (IM)- (grün) und Multiple QTL Mapping (MQM)-Analysergebnisse (rot).

3.5 QTL-Analysen

Bereiche in der genetischen Karte, die mit der Merkmalsausprägung für die *Plasmopara*-Resistenz im Zusammenhang stehen, wurden mittels Intervall Mapping (IM) lokalisiert. Dabei wurden in der integrierten Karte LOD-Werte oberhalb der Signifikanzgrenze auf den LGs 09 und 18 identifiziert (Tabelle 8, Abbildung 10, Abbildung 11). Durch das Setzen von Cofaktoren in den beiden QTL-Bereichen konnte mittels MQM-Analyse ein weiterer QTL auf der LG 05 identifiziert werden (Tabelle 8, Abbildung 12).

Der auf der LG 09 ermittelte QTL (*Rpv10*) erreicht einen maximalen LOD-Wert von 39,9 bei den IM- und 48,1 bei MQM-Analysen und erklärt zwischen 49 und 50 % der beobachteten phänotypischen Varianz in der Population. Die für diesen QTL ermittelten Konfidenzintervalle ($LOD_{max}-1$) betragen 0,8 cM (IM) bzw. 0,5 cM (MQM). Der gleiche QTL wurde auch auf der väterlichen ‘Solaris’ Karte identifiziert (LOD_{max} 38,7; erklärt 49 % der Varianz), während der LOD-Wert in der mütterlichen Karte die Signifikanzgrenze nicht erreicht (Tabelle 8).

Der auf der LG 18 ermittelte QTL (*Rpv3*) erklärt bis zu 13,3 % der Varianz und besitzt LOD-Werte von 8,2 (IM) und 16,5 (MQM) in der Integrierten Karte. Das Konfidenzintervall beträgt 2,1 cM (IM) bzw. 0,9 cM (MQM) (Abbildung 11, Tabelle 8). Dieser QTL taucht bei den elterlichen Karten nur mütterlicherseits auf (LOD_{max} 8,1; erklärt 13,2 % der Varianz). Der in der väterlichen Karte aufgeführte schwache QTL auf LG 18 befindet sich außerhalb des beschriebenen Locus mit dem randständigen VMC2A3 als benachbartem Marker.

Der nur in den MQM-Analysen identifizierte Neben-QTL auf der LG 05 (*Rpv11*) wurde väterlicherseits vererbt, weist einen maximalen LOD-Wert von 4,7 auf und erklärt 3,0 % der phänotypischen Varianz. Auf der LG 03 konnte in der väterlichen Karte ein weiterer schwacher QTL (LOD_{max} 2,3; erklärt 2,9 % der Varianz) lediglich bei der IM-Analyse identifiziert werden. Bei der MQM-Analyse und in den Berechnungen mit der Integrierten Karte trat dieser nicht auf.

Die QTLs in den drei Karten (integrierte, väterliche und mütterliche) befinden sich immer zwischen den gleichen flankierenden Markern, weisen jedoch unterschiedliche absolute Positionen, gemessen in cM, auf (siehe Tabelle 8). Die beobachteten Verschiebungen entstehen durch die unterschiedliche Anzahl an Markern und den daraus resultierenden variierenden Gesamtlängen der Kopplungsgruppe. Im Fall der LG 18 fehlen beispielsweise die vier oberen Marker in der Gf.Ga-52-42-Karte, wodurch sich die errechnete Länge der LG um 59 cM und damit um 72 % verringert (siehe Tabelle 7).

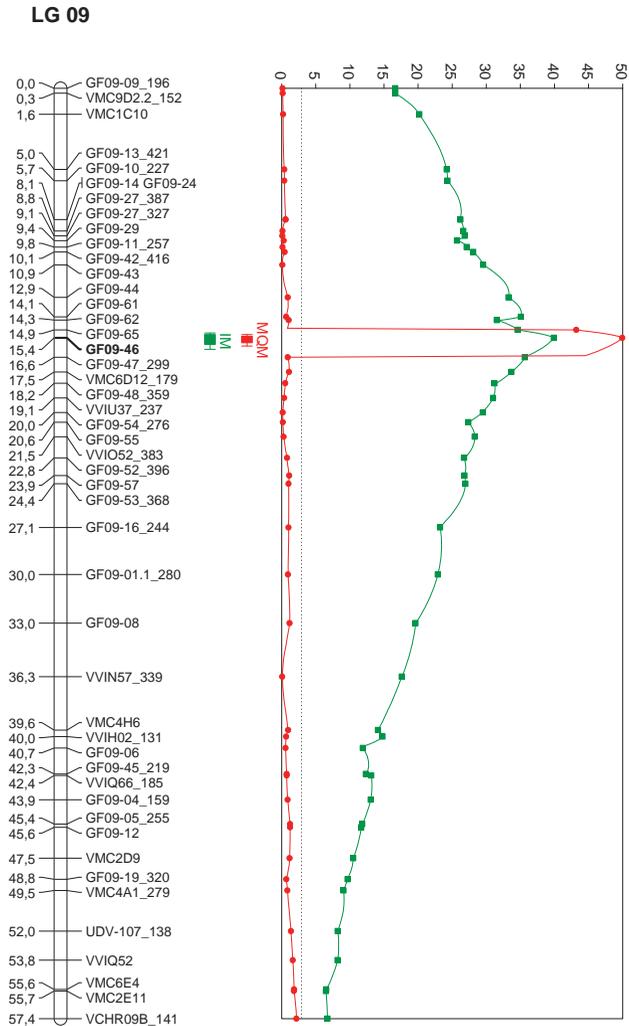


Abbildung 10: Quantitative Faktoren der Merkmalsausprägung (LOD) der *P. viticola*-Resistenz auf LG 09 der integrierten Karte. Markerabstände in centi Morgan (cM). Interval Mapping (IM, grün, Quadrate) und Multiple QTL Mapping (MQM, rot, Kreise) mit Angabe der 1-LOD- (Box) und 2-LOD- (Linie) Konfidenzintervalle. Die Kopplungsgruppen (LG)-spezifische Signifikanzschwelle von 2,9 wird durch die gepunktete Linie gekennzeichnet.

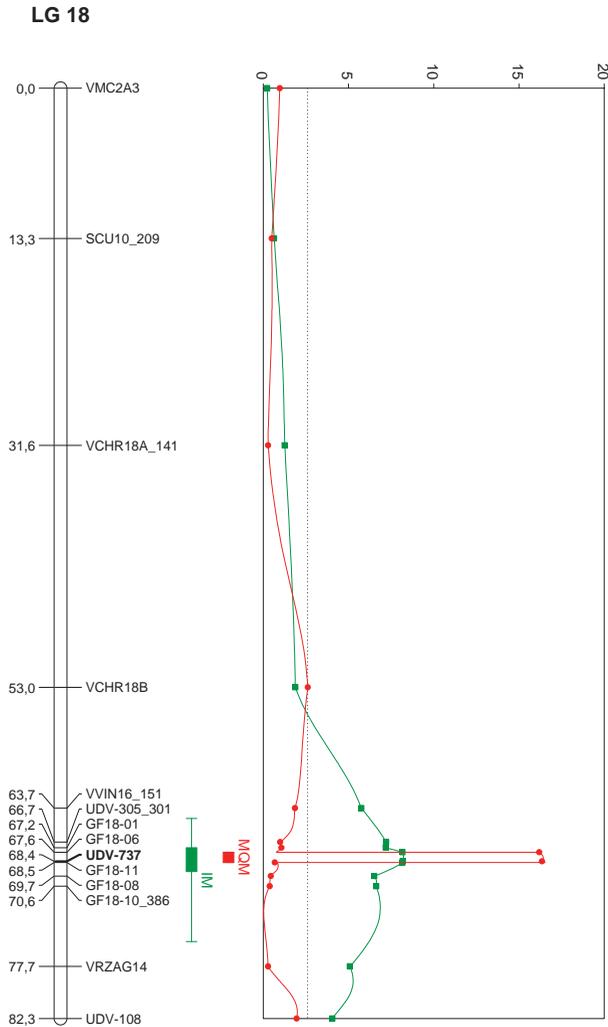


Abbildung 11: Quantitative Faktoren der Merkmalsausprägung (LOD) der *P. viticola* Resistenz auf LG 18 der integrierten Karte. Markerabstände in cM. IM (grün, Quadrate) und MQM (rot, Kreise) mit Angabe der 1-LOD- (Box) und 2-LOD- (Linie) Konfidenzintervalle. Die Kopplungsgruppen (LG)-spezifische Signifikanzschwelle von 2,7 wird durch die gepunktete Linie gekennzeichnet.

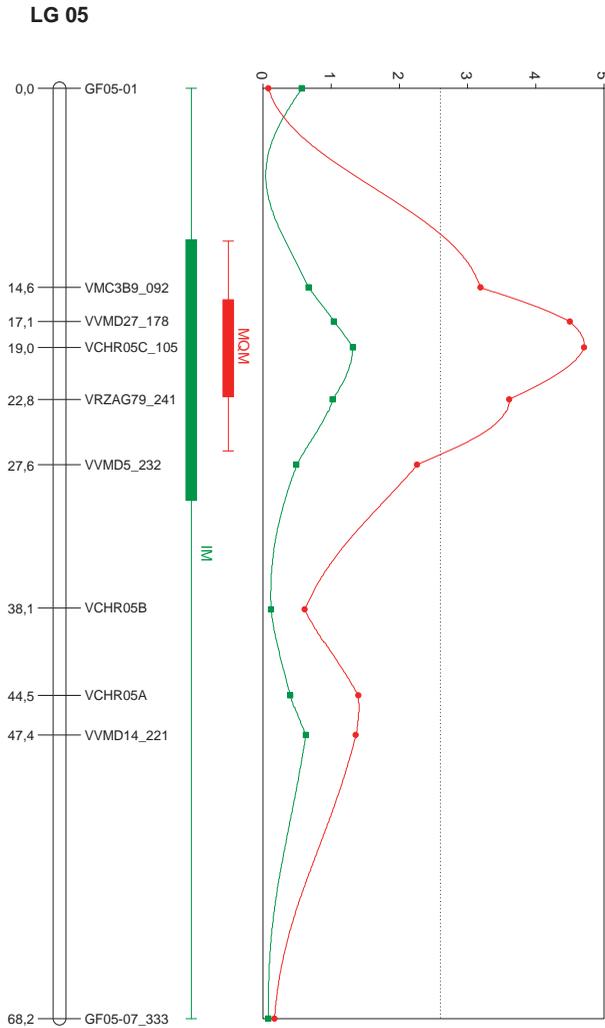


Abbildung 12: Quantitative Faktoren der Merkmalsausprägung (LOD) der *P. viticola* Resistenz auf LG 05 der integrierten Karte. Markerabstände in cM. IM (grün, Quadrate) und MQM (rot, Kreise) mit Angabe der 1-LOD- (Box) und 2-LOD- (Linie) Konfidenzintervalle. Die LG Kopplungsgruppen (LG)-spezifische Signifikanzschwelle von 2,6 wird durch die gepunktete Linie gekennzeichnet.

Tabelle 8: Identifizierte QTL in der Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x ‘Solaris’.

Karte	LG ^a	Typ	LOD _{max}	LG spez.	Signifikanz- grenze ^b	Signifikanz- grenze genomweit ^b	LOD _{max} Position ^c	Konfidenzintervall (cM)		Erklärte Varianz	Cofactor	nächster Marker
								[LOD _{max} -1]	[LOD _{max} -2]			
Integriert	09	IM	39.92	2.9	4.1	15.4 cM	15.2 - 16.0	15.1 - 16.4	50.0 %			GF09-46
		MQM	48.08	2.9	4.1	15.4 cM	15.3 - 15.8	15.2 - 16.1	49.1 %	GF09-46		GF09-46
	18	IM	8.22	2.7	4.1	68.0 cM	67.2 - 69.3	64.5 - 75.5	13.3 %			UDV-737
		MQM	16.53	2.7	4.1	68.5 cM	67.6 - 68.5	67.6 - 68.5	12.5 %	UDV-737		UDV-737
	05	MQM	4.73	2.6	4.1	19.0 cM	15.4 - 22.6	10.9 - 26.5	3.0 %			VCHR05C
Gf.Ga-52-42	09	IM	- ^d	1.7	2.9	-	-	-	-			
		MQM	- ^d	1.7	2.9	-	-	-	-			
	18	IM	8.12	1.5	2.9	3.2 cM	1.5 - 3.7	0.5 - 14.6	13.2 %			UDV-737
		MQM	8.12	1.5	2.9	3.2 cM	3.0 - 3.4	3.0 - 3.4	13.2 %	UDV-737		UDV-737
	05	MQM	- ^d	1.5	2.9	-	-	-	-			
‘Solaris’	09	IM	38.73	1.6	2.7	15.0 cM	14.5 - 15.7	14.5 - 15.7	49.0 %			GF09-46
		MQM	38.73	1.6	2.7	15.0 cM	14.5 - 15.7	14.5 - 15.7	49.0 %	GF09-46		GF09-46
	18	IM	- ^d	1.5	2.7	-	-	-	-			
		MQM	1.99	1.5	2.7	0.0 cM	0 - 15.8	-	1.7 %			VMC2A3
	03	IM	2.29	1.3	2.7	40.7 cM	19.5 - 45.4	3.5 - 48.4	2.9 %			VVIH02
	05	MQM	1.57	1.5	2.7	17.0 cM	8.0 - 26.0	-	1.4 %			VCHR05C

^b Anhand von 1,000 Permutationen bei $\alpha = 0,05$ geschätzt

^c QTL flankierende Marker sind identisch, Positionsunterschiede erklären sich durch verschiedene LG-Längen.

^d LOD-Wert unter Signifikanzgrenze

3.6 Effekt der Pyramidisierung von Resistenzen

Von besonderem Interesse für die Züchtung sind Individuen der Kreuzungspopulation, die eine Kombination (Pyramidisierung) beider identifizierter Resistenzloci aufweisen. Um den Effekt der Pyramidisierung auf die Resistenzausprägung zu untersuchen, wurde die Population anhand des Auftretens bzw. Fehlens der resistenzkorrelierenden Allele der Marker GF09-46 auf LG 09 und UDV-737 auf LG 18 unterteilt. Die Häufigkeitsverteilung der Resistenzklassen in den vier Gruppen von Genotypen wurde miteinander verglichen (Abbildung 13). Die Gruppe mit den Individuen, denen beide resistenzkorrelierenden Allellängen fehlen, weist im Mittel eine deutlich erhöhte Anfälligkeit auf ($x=2,6 \pm 1,2$). Dies zeigt sich in einer Verschiebung der Häufigkeitsverteilung zugunsten der niedrigeren Resistenzklassen.

Die Gruppe mit den resistenzkorrelierenden Allelen an beiden Genorten weist im Mittel den höchsten Resistenzgrad auf ($x=6,7 \pm 1,2$) und eine zugunsten der höheren Resistenzen verschobene Häufigkeitsverteilung. Die beiden Gruppen mit resistenzkorrelierten Allelen an jeweils nur einem Genort zeigen sowohl bezüglich des Resistenzgrades, als auch bezüglich

der Häufigkeitsverteilung ein intermediäres Verhalten. Die varianzanalytische Verrechnung ergab statistisch signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede zwischen den Datensätzen.

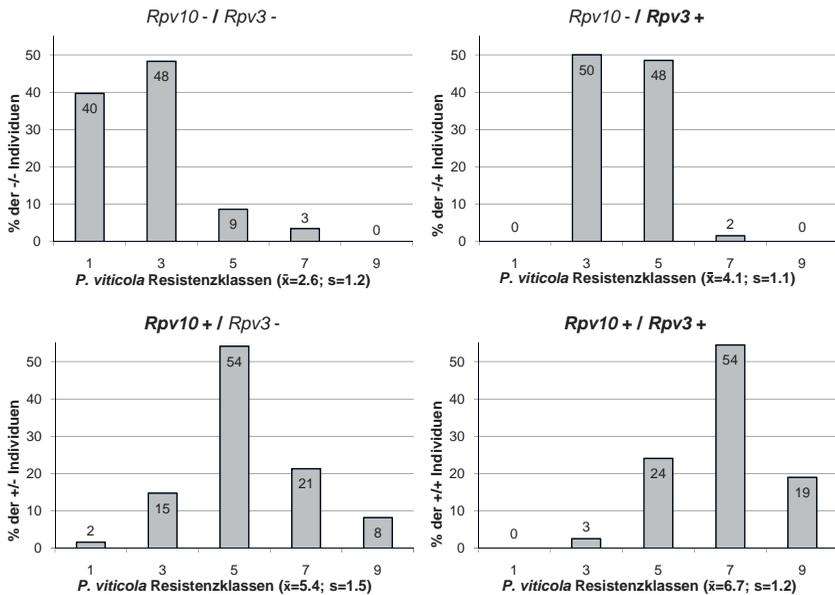


Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der Resistenzklassen bei Abwesenheit (-) oder Vorhandensein (+) der resistenzkorrelierten Allelängen der Marker GF09-46 auf LG 09 und UDV-737 auf LG 18. Mittelwert und Standardabweichung der Gruppen sind in Klammern angegeben (Schwander *et al.* 2011).

Um die Unterschiede zwischen den vier Gruppen mit einer weiteren Darstellung zu veranschaulichen wurden zusätzlich Box-Plots der vier Gruppen erstellt (Abbildung 14). Hier sind die Unterschiede in der Resistenzausprägung zwischen den vier Gruppen anhand der Mediane (schwarze waagrechte Balken) und der Boxen, welche 50% des Datenumfangs repräsentieren deutlich zu erkennen. Die „Whisker“ geben den 1,5-fachen Vertrauensbereich an und Datenpunkte außerhalb dieses Vertrauensbereiches sind durch Kreise gekennzeichnet. In dieser Darstellung wird auch deutlich, dass die durch den *Rpv10*-Locus vermittelte Resistenzausprägung stärker ist als die des *Rpv3*-Locus.

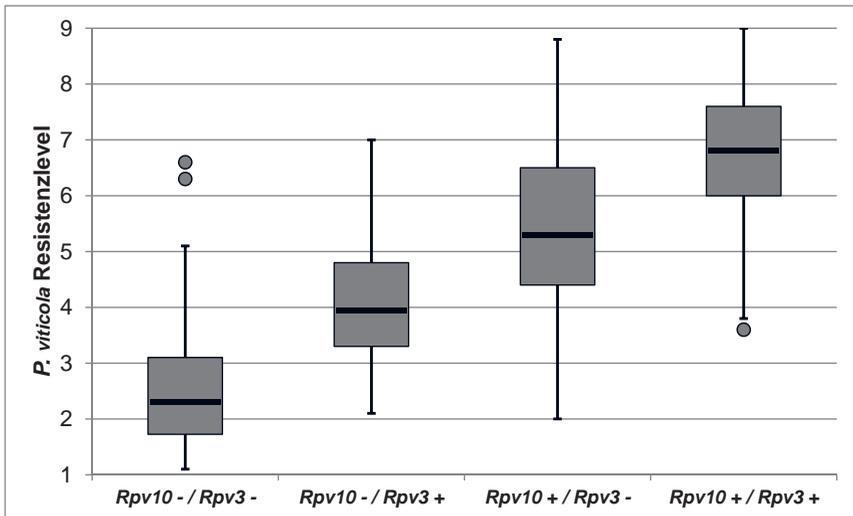


Abbildung 14: Darstellung der Resistenzausprägung im Box-Plot bei Abwesenheit (-) oder Vorhandensein (+) der resistenzkorrelierenden Allellängen der Marker GF09-46 auf LG 09 und UDV-737 auf LG 18. Einzelne Datenpunkte außerhalb des 1,5-fachen Vertrauensbereiches der „Whisker“ sind durch Kreise gekennzeichnet.

3.7 Abgleich des *Rpv10*-Locus mit dem Referenzgenom

Die annotierte genomische Sequenz des ‘Pinot Noir’ Inzuchtstamms PN40024 ermöglicht die Suche nach Genpositionen und -funktionen. Über die im „Grape Genome Browser“ (<http://www.genoscope.cns.fr/Vitis>) hinterlegte „Genewise Uniprot“ Datenbank (<http://www.uniprot.org>) konnte die zum *Rpv10*-Locus korrespondierende Sequenz in der physikalischen Karte entsprechend betrachtet werden. In einem ersten Ansatz wurde ein erweiterter Bereich um die ermittelte QTL-Region zwischen den Markern GF09-14 (Position: 2,4 Mb) und GF09-16 (Position: 5,9 Mb) (Abbildung 15b) auf der LG 09 (Abbildung 15a) untersucht. Dabei zeigte sich, dass neben einer Vielzahl putativer Rezeptorkinasen (u. a. Serin/Threonin-Protein-Kinasen und Phosphatasen) eine besonders hohe Anzahl von 26 Resistenzgenanaloga (RGAs) vom NBS-LRR-Typ in diesem Bereich annotiert waren. Die meisten RGAs waren in drei Clustern mit 3, 7 und 13 Genen in Regionen von 31, 102 bzw. 404 kb Umfang angeordnet (Abbildung 15b). Dabei zeigten die Gene des ersten Clusters Homologien zu RGAs, welche in *Vitis riparia* (Di Gaspero & Cipriani 2003) und *V. bryoniifolia* (Wang & Wang 2006) identifiziert worden waren. Cluster zwei enthielt vier *V. vinifera*-RGAs (Donald *et al.* 2002) sowie drei weitere NBS-LRR-Homologe. Dreizehn

V. amurensis-Resistenzproteinkandidaten (Di Gaspero & Cipriani 2003) waren im dritten Cluster organisiert. Drei weitere NBS-LRRs befanden sich außerhalb der Cluster. Eines dieser RGAs war zwischen den Markern GF09-46 und GF09-47 lokalisiert und besitzt Homologie zu einem in *V. riparia* identifizierten NBS-LRR-Gen (Di Gaspero & Cipriani 2003).

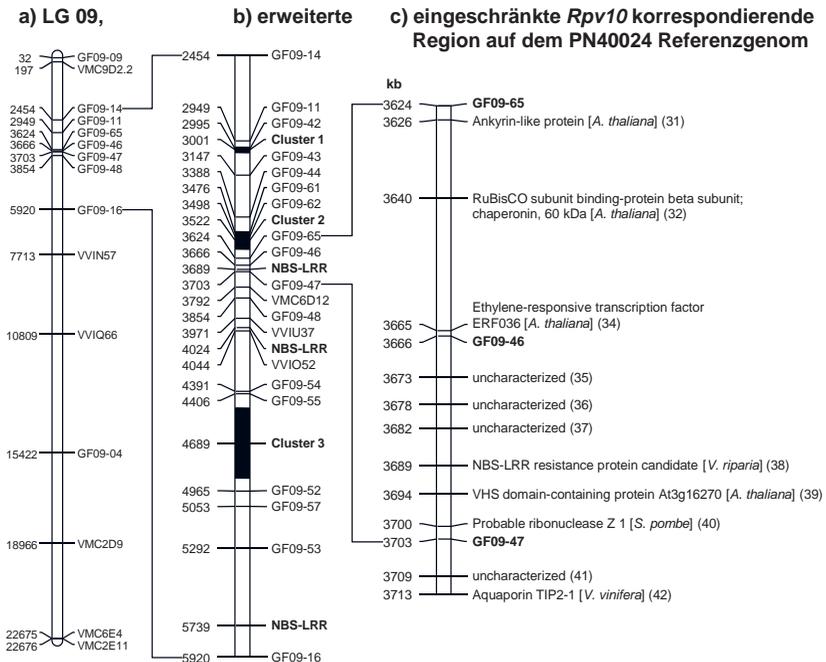


Abbildung 15: a) Physikalische Karte der Kopplungsgruppe 09 des PN40024-Referenzgenoms (nur ausgewählte Marker), b) die erweiterte QTL-Region mit NBS-LRR-, „Clustern“ und c) die mit *Rpv10* korrespondierende Region auf der PN40024-Sequenz mit den vorhergesagten Proteinen zwischen den flankierenden SSR-Markern. Die Genoscope-Annotationen besitzen die Kennnummern GSVIVT010170**001 (**=Ziffern in Klammern).

Durch das Kartieren von neu entwickelten Locus-spezifischen Markern konnte der QTL auf eine kleinere Region zwischen den flankierenden Markern GF09-65 und GF09-47 mit dem zentralen Marker GF09-46 eingeschränkt werden (Abbildung 15c). Dieser 79 kb umfassende Bereich enthält jedoch keines der drei aufgeführten Cluster, sondern nur das beschriebene singuläre *V. riparia*-homologe NBS-LRR-Gen. Ansonsten waren codierende Raster für acht weitere Proteine zwischen den flankierenden Markern im Referenzgenom annotiert. Dabei handelte es sich um ein Protein mit repetitivem Ankyrin-Motiv, eines, das als Chaperonin an

eine RuBisCO-Untereinheit bindet, einen Ethylen-sensitiven Transkriptionsfaktor, ein Protein mit einer VHS-Domäne (Vps27p, Hrs und STAM-Domäne bei Proteinen mit Beteiligung am Membrantransport), ein Protein mit möglicher Ribonuclease-Funktion sowie drei vorhergesagte Proteine mit unbekannter Funktion. Erwähnenswert ist zudem ein Aquaporin TIP2-1, welches sich zwar knapp außerhalb der flankierenden Marker befindet, bei dem jedoch in Expressionsstudien an *V. amurensis* eine erhöhte Expression nach einer *P. viticola*-Infektion nachgewiesen werden konnte (Wu *et al.* 2010).

3.8 Stammbaum der Kreuzungspopulation

Bei den Markeranalysen wurde neben den Individuen der Kreuzungspopulation auch die DNA naher Vorfahren getestet, soweit diese verfügbar war. Die erhaltenen Daten bestätigen ‘Bacchus’ und ‘Villard Blanc’ als Eltern des Zuchtstammes Gf.Ga-52-42 und ‘Merzling’ als Mutter von ‘Solaris’. Da es sich bei Geisenheim 6493 um die Pollenmischung einer Kreuzungspopulation handelt, ist hierfür kein Genotyp verfügbar. Im „Vitis International Variety Catalogue“ (<http://www.vivc.de>) waren zwei mögliche Abstammungen für diese Population angegeben (Abbildung 17b und c). In der einen Version wurde eine Kreuzung zwischen ‘Zarya Severa’ (‘Seyanets Malengra’ x *V. amurensis*) und ‘Muscat Ottonel’ angeführt (bestätigt durch Lott *et al.* 2010; Staatliches Weinbauinstitut Freiburg 2007), während in der zweiten Version ‘Saperavi Severnyi’ (‘Severnyi’ (‘Seyanets Malengra’ x *V. amurensis*) x ‘Saperavi’) als mütterlicher Kreuzungspartner für Geisenheim 6493 beschrieben wird (bestätigt durch Becker 1981; Hillebrand *et al.* 2003).

Um die korrekte Abstammung zu identifizieren, wurde DNA von ‘Muskat Ottonel’, ‘Zarya Severa’, ‘Severnyi’ und einer als ‘Saperavi Severnyi’ benannten Akzession mit SSR-Markern analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass ‘Severnyi’ und die ‘Saperavi Severnyi’-Akzession identische Allelmuster aufwiesen. Ampelographische Untersuchungen ergaben, dass es sich bei beiden Akzessionen um ‘Severnyi’, wie in der „Ampelografija der USSR“ (1955) beschrieben, handelt (Frau Dr. E. Maul, pers. Mitteilung). Beim Abgleich der ‘Solaris’-Allele stellte sich heraus, dass das väterliche Allel immer mit einem der Allele von ‘Severnyi’ oder ‘Muskat Ottonel’ übereinstimmte. Dies konnte bei ‘Severnyi’ mit 57 SSR-Markern und für ‘Muskat Ottonel’ mit 27 SSR-Markern belegt werden. Die übrigen Marker erbrachten wegen Homozygotie, Nullallelen oder durch fehlende Daten keine Bestätigung, waren jedoch auch nie widersprüchlich. Das auffällig starke Ungleichgewicht an Markern lässt sich mit der hohen Markerdichte um den *Rpv 10*-Locus erklären, der von ‘Severnyi’ vererbt wurde.

Um ‘Zarya Severa’ als Vorfahren klar ausschließen zu können, wurde diese Sorte mit 58 SSR-Markern getestet. In sieben Fällen (etwa 1/8) weist ‘Solaris’ Allele mit Fragmentlängen auf, die väterlich vererbt wurden (nicht in ‘Merzling’) aber weder von ‘Zarya Severa’ noch von ‘Muskat Ottonel’, jedoch von ‘Severnyi’ stammen können. Dies wird in Abbildung 18 beispielhaft an drei Markern veranschaulicht. Eine vollständige Tabelle mit den ermittelten Fragmentlängen aller verwendeten SSR-Marker findet sich in Anhang 4. Das Marker-differenzverhältnis und auch das Verhältnis der Allelübereinstimmungen zwischen ‘Zarya Severa’ und ‘Severnyi’ bestätigen, dass diese wie in der Literatur beschrieben Vollgeschwister sind. Abbildung 16 zeigt den aus den Untersuchungen abgeleiteten Stammbaum der Kreuzungspopulation. In dieser werden auch die Herkunft der Resistenzloci und die durch Markerdaten verifizierten Beziehungen veranschaulicht. Die identifizierte ‘Solaris’-Abstammung wird in Abbildung 17 den in der Literatur angegebenen Abstammungen gegenübergestellt.

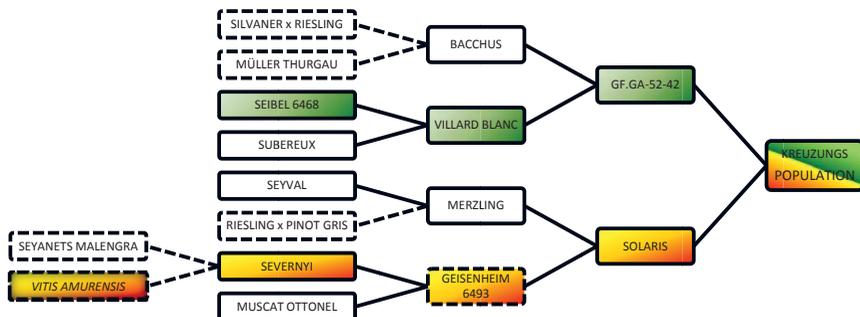


Abbildung 16: Stammbaum der bearbeiteten F1-Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x ‘Solaris’. Durchgezogene Linien kennzeichnen durch SSR-Markerdaten bestätigte Beziehungen zwischen den getesteten Sorten (durchgezogen umrandete Kästen). Gestrichelte Linien und Kästen entsprechen den Angaben im “Vitis International Variety Catalogue” (<http://www.vivc.de>; Stand: Okt. 2011). Grün hinterlegte Sorten besitzen den *Rpv3*-Resistenzlocus, während Akzessionen die *Rpv10* tragen, durch einen gelb-roten Hintergrund gekennzeichnet sind (Schwander *et al.* 2011).

a) Marker VMC3C11.1, LG 17



b) Marker GF09-47, LG 09



c) Marker GF18-06, LG 18



Abbildung 18: Beispielhafte SSR-Marker-Allellängen, die ‘Zarya Severa’ als Vorfahre von ‘Solaris’ ausschließen (a, b) und die Abstammung von ‘Severnyi’ (a, b) und ‘Muscat Ottonel’ (c) unterstützen. Die beobachteten Fragmentlängen (bp) für beide Allele sind unter dem jeweiligen Sortennamen angegeben. a) ‘Solaris’ hat das Allel mit der 120 bp-Fragmentlänge von ‘Merzling’ geerbt, welcher durch alle verwendeten Marker als mütterliches Elternteil von ‘Solaris’ bestätigt wurde. Geisenheim 6493 steht für die Pollenmischung einer Kreuzungspopulation, weshalb keine DNA für diesen Genotyp verfügbar ist. Deshalb muss das 102 bp lange Fragment von einem der Großeltern stammen. In diesem Fall findet sich die entsprechende Fragmentlänge in ‘Severnyi’, wobei das Fehlen dieses Allels in ‘Zarya Severa’ diese Sorte als ‘Solaris’-Vorfahre ausschließt. b) Identische Situation wie in a) mit einem Marker im *Rpv10*-Locus. c) Beispiel für einen Marker, der ‘Muscat Ottonel’ als Großelternanteil von ‘Solaris’ bestätigt. ‘Saperavi Severnyi’ lässt sich durch die Beobachtung, dass sich alle Allele der 58 Marker auf ‘Severnyi’ oder ‘Muscat Ottonel’ zurückführen lassen, ebenfalls als Großelternanteil ausschließen. Andernfalls müsste man bei bis zu ¼ der Allele (im Fall ausschließlich heterozygoter Marker) die aus ‘Saperavi’ stammenden Allele in ‘Solaris’ beobachten können (Schwander *et al.* 2011).

3.9 Untersuchung ausgewählter Sorten auf den *Rpv10*-Locus

Um weitere Informationen über den *Rpv10*-Locus zu erhalten, wurden ausgewählte Sorten mit zwölf den Locus flankierenden SSR-Markern getestet (Tabelle 9). Die Auswahl erfolgte anhand des Abstands zum QTL_{max}, dem Informationsgehalt des Markers und der Kombinierbarkeit im Multiplex. Dabei zeigt sich, dass das Allelmuster von ‘Zarya Severa’ die Beobachtungen an den 58 SSR-Markern bestätigt. Vier Locus-nahe SSR-Marker (GF09-44, -61, -47 und -48) weisen die resistenzkorrelierenden Fragmentlängen auf, die übrigen acht Marker, inklusive dem im QTL zentral liegenden GF09-46, nicht. Dies schließt ‘Zarya Severa’ als Überträger des *Rpv10*-Resistenzlocus an ‘Solaris’ aus.

Tabelle 9: Untersuchung ausgewählter Sorten mit 12 den *Rpv10*-Locus flankierenden Markern. Die resistenzkorrelierenden Fragmentlängen sind grau hinterlegt.

Markername	Resistenzkorrelierte Fragmentlänge	Gf. Ga-52-42	Solaris	Merzling	Severnyi	Muskat Ottonel	Zarya Severa	Riparia Gloire de Montpellier	Bronner	Rondo	Saint Laurent
GF09-11	256	254	256	277	248	254	260	273	256	256	286
		280	280	280	256	-	-	276	280	-	-
GF09-43	428	422	422	422	428	425	426	418	422	424	424
		426	428	430	-	450	462	447	428	428	-
GF09-44	230	242	230	245	230	236	230	229	230	230	230
		245	245	-	244	245	242	-	245	-	245
GF09-61	408	418	408	405	408	418	408	405	408	408	418
		-	-	-	-	-	418	-	-	-	-
GF09-62	393	409	393	-	393	394	409	-	393	393	409
		-	-	-	-	-	-	-	-	409	-
GF09-65	312	316	312	316	312	316	316	308	312	312	316
		-	-	-	-	-	329	321	-	-	-
GF09-46	416	423	416	406	416	425	407	407	416	416	423
		425	425	425	423	-	423	-	425	423	425
GF09-47	299	296	296	296	296	292	296	289	296	296	296
		296	299	-	299	296	299	-	299	299	-
GF09-48	359	349	349	349	349	349	349	351	349	349	349
		349	359	356	359	-	359	364	359	359	-
GF09-55	249	238	249	262	249	237	260	248	249	249	237
		264	264	264	257	264	-	252	264	264	264
GF09-52	396	393	393	393	393	393	393	393	393	393	393
		393	396	394	396	395	399	396	396	396	-
GF09-57	303	347	303	360	303	365	301	354	303	303	347
		366	366	366	360	-	345	360	366	366	366

In dem Set wurde zudem ‘Riparia Gloire de Montpellier’ getestet, welcher auf der LG 09 den *Rpv5*-Locus aufweist. Mit dieser Untersuchung sollten die Loci nicht nur über ihren Ursprung (amerikanische vs. asiatische Herkunft), sondern auch anhand der Markerdaten voneinander abgegrenzt werden. Es zeigte sich, dass ‘Riparia Gloire de Montpellier’ lediglich bei dem 8,1 cM von der Position des LOD_{max} entfernten Marker GF09-52 die resistenzkorrelierende Fragmentlänge aufweist. Damit konnte abgesichert werden, dass es sich bei *Rpv5* und *Rpv10* um verschiedene Resistenzloci handelt.

Des Weiteren wurden die Neuzüchtungen ‘Rondo’ (Selektion aus der Kreuzungspopulation Geisenheim 6494, angegeben als ‘Zarya Severa’ x ‘Saint Laurent’) und ‘Bronner’ (‘Merzling’ x Geisenheim 6494) untersucht. Die beiden Sorten weisen bei allen 12 SSR-Markern die resistenzkorrelierten Fragmentlängen auf und besitzen damit eindeutig den *Rpv10*-Locus. Dadurch kann ‘Zarya Severa’ auch kein Elternteil der Kreuzungspopulation Geisenheim 6494 sein. Dies implementiert, dass ‘Severnyi’, wie bei ‘Solaris’ bereits aufgezeigt, als Resistenzdonor Verwendung fand. Diese Schlussfolgerung wird auch durch die enge begriffliche Beziehung zwischen den Kreuzungspopulationen Geisenheim 6493 und Geisenheim 6494 unterstützt. Die Kreuzungspartner ‘Saint Laurent’ bei ‘Rondo’ und ‘Merzling’ bei ‘Bronner’ konnten durch die Markerdaten bestätigt werden.

3.10 Untersuchung genetischer Ressourcen

Damit der genetisch neu identifizierte Resistenzlocus *Rpv10* effektiv in die Resistenzzüchtung einfließen kann, sollten Sorten, Zuchtstämme und Wildartakzessionen (im Weiteren Genotypen) mit diesem Locus identifiziert werden. Damit lässt sich der Zuchtprozess flexibler gestalten, da man aus einem breiteren Spektrum an Genotypen für die geplanten Kreuzungen wählen und weitere Eigenschaften berücksichtigen kann. Um diese Untersuchung in einem überschaubaren Rahmen zu halten, wurden aus dem Rebensortiment am Geilweilerhof Genotypen mit *V. amurensis* im Stammbaum über den VIVC (<http://www.vivc.de>) identifiziert. Die 94 ausgewählten Genotypen wurden mit sechs den *Rpv10*-Locus flankierenden Markern untersucht (siehe Tabelle 10). Dafür wurden die funktional besten, eng korrelierenden SSR-Marker in einem Multiplex kombiniert. Die Marker decken dabei einen Bereich von 8,4 cM um den QTL ab (vgl. Abbildung 10). Dabei konnte das bekannte *Rpv10*-tragende Allel in 22 Genotypen eindeutig identifiziert werden (alle sechs Marker weisen die resistenzkorrelierenden Allellängen auf). Bei 70 Sorten trat der Locus nicht oder nicht mit dem vollständigen Muster auf. Die erhobenen Daten lassen bei

zwei Genotypen keine abschließende Beurteilung zu. Lednice C 62 weist zwischen dem QTL flankierenden Marker GF09-65 und dem zentralen Marker GF09-46 einen Rekombinationspunkt auf, weshalb für diesen Genotyp ohne eine präzise Phänotypisierung keine eindeutige Aussage getroffen werden kann, ob der *Rpv10*-Locus vorhanden ist. Der Wildart-Akzession *V. amurensis* cv. Ruprecht (Accession-Nr.: DEU098-1990-444; Sort. Nr. 5011) fehlen drei der resistenzkorrelierenden Fragmentlängen, weist diese jedoch bei dem zentralen Markers GF09-46 auf. Die resistenzkorrelierende Fragmentlänge von GF09-46 (416 bp) konnte in dem getesteten Set ausschließlich bei den *Rpv10*⁺-Genotypen und bei den beiden bereits angesprochenen Genotypen identifiziert werden. Der Marker zeigt somit relativ zuverlässig das Vorhandensein des *Rpv10*-Locus an.

Bei den übrigen flankierenden Markern kann es, wenn man diese einzeln betrachtet, zu falsch positiven Identifikationen kommen, da die resistenzkorrelierende Fragmentlänge nicht ausschließlich auf dem *Rpv10*-tragenden Allel vorkommt. Dies zeigt sich, wenn man die getesteten Marker in Tabelle 10 betrachtet und die resistenzkorrelierende Fragmentlänge nur bei einzelnen Markern auftritt (+), während sie bei den übrigen fehlt (-). Ein mehrmaliges Rekombinationsereignis, ist aufgrund der geringen Markerabstände (8,4 cM zwischen den beiden äußeren Markern) sehr unwahrscheinlich. Mit einem dieser Marker durchgeführte Untersuchungen würden demnach einen Anteil der Genotypen fälschlicherweise als Merkmalsträger identifizierten. Im untersuchten Set war dies bei GF09-44 und GF09-65 für 16 Genotypen (17 %) und bei GF09-47 für 13 Genotypen (14 %) der Fall. Damit sind diese Marker für den Einsatz in der Züchtung zum Screening von Genotypen nur bedingt geeignet. Bei den Markern GF09-11 und GF09-48 trat die resistenzkorrelierende Fragmentlänge nur bei 4 bzw. 3 Sorten auf, die das *Rpv10*-tragende Allel nicht besitzen. Damit ist die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse in einer Untersuchung deutlich reduziert.

In weiteren Untersuchungen von genetischen Ressourcen erlaubt eine Markerkombination mit GF09-11, GF09-46 und GF09-48 eine zuverlässige Identifikation des *Rpv10*-Locus. Aufgrund der unterschiedlichen Fragmentlängen dieser Marker ist dies auch problemlos in einem Multiplexansatz möglich.

Tabelle 10: Genetische Überprüfung von Genotypen mit *V. amurensis*-Abstammung auf das Auftreten des *Rpv10*-Locus. Abstammungen nach den Angaben im VIVC (<http://www.vivc.de>; Stand: Jun. 2011). Das Vorhandensein der resistenzkorrelierenden Allellänge (Zeile 3) wurde durch ein „+“, das Fehlen durch ein „-“ gekennzeichnet. In der letzten Spalte ist das Ergebnis mit *Rpv10*⁺ oder *Rpv10*⁻ zusammengefasst.

	SSR-Marker:	<i>Rpv10</i> -Locus						<i>Rpv10</i>
		GF09-11	GF09-44	GF09-65	GF09-46	GF09-47	GF09-48	
Name	Resistenzkorrekt. Allellänge: Abstammung nach VIVC	256	230	312	416	299	359	
65-151-5	A - 4/13 X LEMBERGER	-	+	-	-	-	-	-
69-2-4	MEDOC NOIR X AMURENSIS	-	+	-	-	-	-	-
80- 13-27	(AMURENSIS)F2 X HARSLEVELUE	-	-	+	-	+	-	-
A - 4/13	(VITIS AMURENSIS X VITIS VINIFERA) X THALLOCYZ LAIOS	-	-	-	-	-	-	-
AGAT DONSKOI	(ZARYA SEVERA X DOLORES) X RUSSKII RANNII	-	-	-	-	-	-	-
ALLEGRO	CHANCELLOR X RONDO	-	-	-	-	-	-	-
AMURENSIS 31-12-19		-	-	-	-	+	-	-
AMURENSIS 31-13-17		+	-	+	-	-	-	-
AMURENSIS 5380		+	-	-	-	-	-	-
AMURENSIS 5325		-	-	+	-	+	-	-
AMURENSIS Gm		-	-	+	-	+	-	-
ANUSHAYUT	C 1262 (AMURENSIS X PERLE VON CSABA) X KARMRAYUT	-	-	-	-	-	-	-
ARCTIK	AMURENSIS X SEVERNY CHERNY	-	-	+	-	-	-	-
AROLANKA 8138	ARON X LANKA	-	-	-	-	-	-	-
AROLANKA 8145	ARON X LANKA	-	-	-	-	-	-	-
BARON	CABERNET SAUVIGNON X BRONNER	+	+	+	+	+	+	+
BASHKANSKII KRASNYI	AMURENSIS X MUSCAT HAMBURG	+	-	-	-	-	-	-
BEICHUN	MUSCAT HAMBURG X AMURENSIS	-	-	-	-	+	+	-
BRONNER	MERZLING X GEISENHEIM 6494	+	+	+	+	+	+	+
BUITUR	RIPARIA X AMURENSIS	-	-	-	-	-	-	-
BURMUNK	AMURENSIS X MUSKAT VENGERSKIJ	-	-	-	-	-	-	-
CABERNET CAROL	CABERNET SAUVIGNON X SOLARIS	+	+	+	+	+	+	+
CABERNET CORTIS	CABERNET SAUVIGNON X SOLARIS	+	+	+	+	+	+	+
CALASTRA	MERZLING X SIBERA	+	+	+	+	+	+	+
CLARA	SOLARIS X MUSCAT BLEU	+	+	+	+	+	+	+
CSARENCI	VINIFERA X AMURENSIS	-	+	-	-	-	-	-
CVETOTSCHNYI	SEVERNYI X (MUSCAT LUNEL X MUSCAT OF ALEXANDRIA)	+	+	+	+	+	+	+
DALNEVOSTOCHNYI RAMMINGA	DALNEVOSTOCHNYI TIKHONOVA X TAEZHNYI IZUMRUD	-	-	-	-	-	-	-
DALNEVOSTOCHNYI TIKHONOVA	AMURENSIS X VINIFERA	-	-	-	-	+	-	-
DNESTROVSKII ROZOVYI	(NIMRANG X AMOURSKEY) X MATHIASZ JANOS	-	+	+	-	+	+	-
DONCSAK	PULJAKORSZKII X (HARSLEVELUE X AMURENSIS) X SZUVOROVEC	+	+	+	+	+	+	+
DROUJBA	MISKET KAILACHKI (MUSKAT HAMBURG X S.V. 12375) X (ZARIA SEVERA X MUSKAT HAMBURG)	-	-	-	-	-	-	-
FESTIVALNYI	SEVERNYI X MUSCAT HAMBURG	-	+	+	-	-	-	-
FIOLETOVYI RANNII	SEVERNYI X MUSCAT HAMBURG	-	-	-	-	-	-	-
GALANTH	SOLARIS X MUSCAT BLEU	-	-	-	-	-	-	-

	SSR-Marker:	Rpv10-Locus						Rpv10
		GF09-11	GF09-44	GF09-65	GF09-46	GF09-47	GF09-48	
Name	Resistenzkorrektur. Allellänge: Abstammung nach VIVC	256	230	312	416	299	359	
GARANT	SOLARIS X MUSCAT BLEU	+	+	+	+	+	+	+
GOLUBOK	SEVERNYI X MIXTURI OF POLLEN: ODESSKII RANNII, 40 LET OKTIABRIA, (ALIKANT BOUSHE X CABERNET SAUVIGNON)	+	+	+	+	+	+	+
IYULSKII	SEVERNYI X MUSCAT HAMBURG	-	-	-	-	-	-	-
KABERAM	CABERNET SAUVIGNON X AMURENSIS	+	+	+	+	+	+	+
KABERNE SEVERNYI	(GALAN X AMURENSIS) X (AMURENSIS X VINIFERA)	-	-	+	-	-	-	-
KARIN	LERNATU X FIOLETOVYI RANNII	-	-	+	-	-	-	-
KARMAHYUT	ADISI X NO 15-7-1 (AMURENSIS X SLADKII CHERNYI)	-	+	-	-	-	-	-
KAZACHKA	(GETSH X AMURENSIS) X FIOLETOVYI RANNII	+	+	+	+	+	+	+
KENTVILLE WHITE 87-2	VINELAND 53035 X MICHURINETZ	-	+	+	-	-	-	-
KORINKA MICHURINA	VITIS AMURENSIS X KORINTHIAKI	-	-	+	-	-	-	-
KOZMA CSFT 2423	(PANNONIA KINCSE X S.V. 5276) X KUNBARAT	-	-	-	-	+	-	-
KRISZTALY	ALFOELD 100 X SV 12375	-	+	-	-	-	-	-
KUNBARAT	(AMURENSIS X VINIFERA) X ITALIA	-	-	-	-	+	-	-
KUNLEANY	(AMURENSIS X VINIFERA) X AFUS ALI	-	+	-	-	-	-	-
LANKA	DATTIER DE ST. VALLIER X DEKORATIVNYI	-	-	-	-	-	-	-
LEDNICE B 76	SEVERNYI X PINOT NOIR	+	+	+	+	+	+	+
LEDNICE C 62	(AMURENSIS X MALINGRE PRECOCE) O.P. X KOCSIS IRMA	-	-	-	+	+	+	?
LEDNICE D 73	(ALICANTE BOUSCHET X CABERNET SAUVIGNON) X AMURENSIS	-	-	-	-	-	-	-
LELA	WELSCHRIESLING X KUNBARAT	-	-	-	-	-	-	-
LYUBITELSKII	RUSSKII KONKORD X MALINGRE PRECOCE	-	-	-	-	-	-	-
MEDOVYI	SEVERNYI X POLLENGEMISCH VON MUSKAT	-	-	+	-	-	-	-
MICHURINETS	AMURENSIS X GETSH	-	-	+	-	+	-	-
MILA	KUNLEANY X MUSCAT OTTONEL	-	+	-	-	-	-	-
MUSKAT DONSKOI	SEVERNYI X MUSKAT BELYI	-	-	-	-	-	-	-
NAGRADA	RUSSKII KONKORD X ARAKSENI BELYI	-	-	-	-	-	-	-
NEGRU DE YALOVEN	MERLOT NOIR X AMURENSIS	-	-	-	-	-	-	-
NERKARAT	C 1262 (AMURENSIS X PERLE VON CSABA) X KARMRAYUT	-	-	-	-	-	-	-
OLIMPIJEC	(CABERNET SAUVIGNON X MUSKAT DONSKOI) X SZTYEPNOI	+	+	+	+	+	+	+
OSELLA	SOLARIS X MUSCAT BLEU	+	+	+	+	+	+	+
PETRA	KUNBARAT X PINOT NOIR	-	+	-	-	+	-	-
PRIGODNYI	SEVERNYI X POLLENGEMISCH MUSKAT-CVS	-	-	+	-	-	-	-
PRIOR	FREIBURG 4-61 X BRONNER	+	+	-	-	-	-	-
RANI RIZLING	WELSCHRIESLING X KUNBARAT	-	-	-	-	+	-	-
RONDO	SEVERNYI X SAINT LAURENT	+	+	+	+	+	+	+
RUSSKII KONKORD	CONCORD X AMURENSIS	-	+	+	-	-	-	-
RUSSKII RANNII	SHASLA SEVERNAYA X MICHURINETS	-	-	-	-	-	-	-
SARMAT	FIOLETOVYI RANNII X STEPNOI	+	+	+	+	+	+	+
SEVERNYI	SEYANETS MALENGRA X AMURENSIS	+	+	+	+	+	+	+

	SSR-Marker:	<i>Rpv10</i> -Locus						<i>Rpv10</i>
		GF09-11	GF09-44	GF09-65	GF09-46	GF09-47	GF09-48	
Name	Resistenzkorrr. Allellänge: Abstammung nach VIVC	256	230	312	416	299	359	
SEVERNYI BELYI	unbekannt	-	-	-	-	-	-	-
SEVERNYI GYULYABI	SEVERNYI X GYULYABI	-	-	-	-	-	-	-
SHASLA SEVERNAYA	SEVERNYI X CHASSELAS ROSE	-	-	-	-	-	-	-
SIBERA	SAPERAVI SEVERNYI X (FOSTER'S WHITE SEEDLING X PRACHITRAUBE)	+	+	+	+	+	+	+
SIZYI	HARSLEVELUE X (AMURENSIS X PINOT NOIR)	-	+	-	-	-	-	-
SKOROSPELYI DONSKOI	VINIFERA X AMURENSIS	-	-	-	-	-	-	-
SLAVA	TAGOBI X (TAGOBI X AMURENSIS)	+	+	+	+	+	+	+
SOLARIS	MERZLING X GEISENHEIM 6493	+	+	+	+	+	+	+
SOPERNIK	SEVERNYI X SMES PYLTSY MUSKATOV	-	-	-	-	-	-	-
SPARTANETS MAGARACHA	SEIBEL 13666 X SAPERAVI SEVERNII	-	-	-	-	-	-	-
SREMSKI KARLOVCI 77- 4- 5	KUNBARAT X TRAMINER	-	+	-	-	-	-	-
SUVOROVETS	SEVERNYI X MUSCAT CULTANINA	-	-	+	-	-	-	-
TSVETOCHNYI	SEVERNYI X (MUSCAT BELYI + MUSCAT VENGERSKII + MUSCAT OF ALEXSANDRIISKII)	-	-	-	-	-	-	-
VISHNEVYI RANNII	VIR P-35-20 (NIMRANG X VITIS AMURENSIS) X MIXTURE OF POLLEN PINOT RANNII, 40 LET OKTYABRYA	-	-	-	-	-	-	-
VITIS AMURENSIS RUPRECHT 5011	Accession Nr.: DEU098-1990-444	-	+	-	+	+	-	?
VOSTORG	(ZARYA SEVERA X DOLORES) X RUSSKII RANNII	-	-	-	-	-	-	-
VYDVIZHENETS	SEVERNYI X MIXTURE OF POLLEN MUSCAT VENGERSKII + MUSCAT BELYI + MUSCAT ALEXANDRIISKII	-	-	-	-	-	-	-
VYNO SLIVYI	GETSH X 14-19-42 (MUSCAT HAMBURG X AMURENSIS)	+	+	+	+	+	+	+
ZARYA SEVERA	SEYANETS MALENGRA X AMURENSIS	-	+	-	-	+	+	-
ZLATA	IRSAI OLIVER X KUNLEANY	-	-	-	-	-	-	-
ZOLOTISTYI USTOICHIVYI	VIR II-35-20 (NIMRANG X AMURENSIS) O.P.	-	-	-	-	-	-	-

Um die züchterische Relevanz der identifizierten *Rpv10*⁺-Genotypen darzustellen, wurden diese anhand der Anzahl an Generationen nach dem Einkreuzen von *V. amurensis* in Spalten angeordnet (siehe Tabelle 11). Damit die Abstammung der Sorten, soweit dies nachvollziehbar war, ersichtlich wird, wurden die Sorten entsprechend in den Zeilen angeordnet. Dabei ist auffällig, dass der überwiegende Teil von 16 Sorten und Zuchtstämmen der *Rpv10*⁺ getesteten Genotypen Nachkommen von ‘Severnyi’ sind.

Tabelle 11: Identifizierte Genotypen mit dem *Rpv10*-Locus. Anordnung in den Spalten anhand der Generationen nach der Introgression von *V. amurensis*. Die Anordnung in den Zeilen erfolgte anhand der Abstammung. Kursive Sorten in Klammern wurden nicht getestet, sondern anhand der im VIVC vorgegebenen Abstammung als Resistenzüberträger aufgeführt.

1. Generation	2. Generation	3. Generation	4. Generation
KABERAM			
SEVERNYI	CVETOTSCHNYI		
	<i>(FIOLETOVYI RANNII)</i>	SARMAT	
	GOLUBOK		
	LEDNICE B 76		
	RONDO		
	<i>(GEISENHEIM 6494)</i>	BRONNER	BARON
	<i>(GEISENHEIM 6493)</i>	SOLARIS	CABERNET CAROL
			CABERNET CORTIS
			CLARA
			GARANT
			OSELLA
	<i>(SAPERAVI SEVERNYI)</i>	SIBERA	CALASTRA
	KAZACHKA		
	SLAVA		
	VYNOSLIVYI		
		DONCSAK	
		OLIMPIJEC	

4 Diskussion

4.1 Phänotypische Evaluierung der *Plasmopara*-Resistenz

Der Blattscheibentest ist eine gut etablierte und häufig angewandte Methode, um zuverlässig Resistenzausprägungen gegen den Falschen Mehltau an Reben zu bestimmen (z. B. Casagrande *et al.* 2011; Deglene-Benbrahim *et al.* 2010; Eibach *et al.* 1989; Eibach *et al.* 2007; Sotolar 2007). Standardisierte Infektionsbedingungen und eine hohe Durchsatzrate erlauben reproduzierbare Untersuchungen mit hohen Individuenzahlen, wie sie in Kreuzungspopulationen vorkommen. In der Literatur wird belegt, dass die Daten gute Korrelationen zu denen von natürlichem Befall im Weinberg, künstlich infizierten Topfpflanzen und abgetrennten, künstlich infizierten Blättern aufweisen (Bellin *et al.* 2009; Boso & Kassemeyer 2008; Boso *et al.* 2006; Brown *et al.* 1999; Eibach *et al.* 1989). Es ist beschrieben, dass die Umwelteinflüsse durch die Verwendung von Gewächshauspflanzen reduziert werden können, was in Kombination mit dem kontrollierten Blattscheibentest zu einer Verkleinerung des QTL-Konfidenzintervalls führt (Bellin *et al.* 2009). In der verwendeten Kreuzungspopulation konnte durch die Verwendung von Gewächshauspflanzen zudem die Ausbildung einer starken Behaarung auf der Blattunterseite, wie sie bei der Elternsorte ‘Solaris’ im Freiland auftritt (siehe Abbildung 7), verhindert werden. Damit konnte der Einfluss der, als präformierte Resistenzbarriere bekannten, Blattbehaarung auf die Resistenzausprägung gegen *P. viticola* (Kortekamp & Zyprian 1999) weitgehend ausgeschlossen werden.

Im Vergleich zu den Freilandbeobachtungen weist die Elternsorte ‘Solaris’ in diesen Untersuchungen ein relativ geringes Resistenzniveau auf (Mittelwert: 4,6; Abbildung 5). Neben einem hohen Infektionsdruck durch die künstliche Sporenapplikation und der strikteren Einteilung der Resistenzklassen in dieser Untersuchung könnte auch die im Freiland beobachtete, deutlich stärker ausgeprägte Blattbehaarung dieser Sorte den Unterschied erklären. Für die feldresistenten Wildarten *V. davidii* und *V. doaniana* ist die dichte Blattbehaarung ein essentieller Resistenzfaktor, da *P. viticola* nach dem Ausschalten dieser Barriere durch eine Detergenzbehandlung die Blätter erfolgreich infizieren konnte (Kortekamp & Zyprian 1999). Somit könnte die Kombination aus dichter Blattbehaarung und *Rpv10*-Locus die hohe Feldresistenz von ‘Solaris’ erklären.

Quantitative Merkmale weisen eine kontinuierliche phänotypische Varianz in einer Kreuzungspopulation auf. Den QTL-Berechnungen liegt deshalb die statistische Modellannahme eines normalverteilten qualitativen Merkmals zugrunde (Doerge 2002). In der

untersuchten Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x ‘Solaris’ zeigt sich die Resistenz-
ausprägung gegen den Falschen Mehltau in den graphischen Darstellungen als annähernd
normalverteilt (Abbildung 5 und Abbildung 6). Bei den durchgeführten statistischen Tests
ermittelte der Kolmorov-Smirnov-Test eine signifikante Übereinstimmung des Datensatzes
mit einer Normalverteilung. Die übrigen Testverfahren ergaben, dass die Verteilung im
Datensatz von der einer Normalverteilung abweicht. Da bei den einzelnen statistischen Tests
die Daten unterschiedlich gewertet werden und sie dadurch auch unterschiedlich sensitiv sind,
kommt es zu diesen widersprüchlichen Ergebnissen. Gründe dafür können geringe Proben-
zahlen, grobe Bewertungskriterien und die bei einigen Tests vorhandene hohe Gewichtung
der Randbereiche sein. Somit ist anzunehmen, dass der erhobene Datensatz zur *Plasmopara*-
Resistenz zwar nicht optimal normalverteilt ist, dieser Verteilung jedoch sehr nahe kommt und
damit für QTL-Berechnungen geeignet ist.

Die phänotypische Verteilung eines quantitativen Merkmals ergibt sich aus der Überlagerung
der Effekte, die von den beteiligten Loci hervorgerufen werden. In der untersuchten
Kreuzungspopulation mit den zwei stark ausgeprägten Loci *Rpv3* und *Rpv10* kann die
resultierende Verteilung (Abbildung 5) durch das Aufsummieren der vier genotypischen
Verteilungen (Abbildung 13) nachvollzogen werden. Unter der Annahme, dass der Phänotyp
durch zwei ähnlich stark ausgeprägte Loci bestimmt wird, ist eine Verteilung von $\frac{1}{4}$ anfälliger
Pflanzen (ohne Resistenzlocus), $\frac{1}{2}$ teilresistenter Pflanzen ($\frac{1}{4}$ nur mit *Rpv3* & $\frac{1}{4}$ nur mit
Rpv10) und $\frac{1}{4}$ hochresistenten Pflanzen (mit *Rpv3* & *Rpv10*) zu erwarten. Die reale
Verteilung der Kreuzungspopulation folgt mit 22 %, 25 %, 23 % und 30 % etwa diesem
Muster. Der beobachtete additive Effekt auf den Resistenzgrad durch die Kombination der
Resistenzloci *Rpv3* und *Rpv10* belegt die Eignung dieser beiden Loci für eine effektive
Pyramidisierung von *Plasmopara*-Resistenzen.

4.2 Stilben-Analyse und Kallose-Nachweis

In ‘Solaris’ kommt es nach einer *Plasmopara*-Infektion innerhalb von 72 h zu einer
Akkumulation der zu den Phytoalexinen gehörenden Stilbene Resveratrol, Pterostilben, ϵ - und
 δ -Viniiferin (Pezet *et al.* 2004a; Pezet *et al.* 2004b). Diese führen bereits in niedrigen
Konzentrationen zu einer deutlichen Reduktion der Zoosporenmobilität und hemmen die
Entwicklung von *P. viticola*, was in verringerten Sporulationsraten resultiert (Pezet *et al.*
2004a). Damit stellen diese fungitoxisch wirksamen Substanzen einen effektiven
Resistenzmechanismus dar. Um diesen als weiteres phänotypisches Merkmal zu kartieren

wurden die Stilbenkonzentrationen der Nachkommenschaft ermittelt. Es ließ sich jedoch kein linearer Zusammenhang zwischen der Resistenzausprägung und der Konzentration der einzelnen Stilbene feststellen, wie er in Pezet *et al.* (2004b) und Gindro *et al.* (2006) beschrieben wurde. Auch in den Proben von ‘Solaris’ wurden die in den Veröffentlichungen ermittelten Stilbenkonzentrationen nicht erreicht. Markeranalysen erwiesen eine genetische Übereinstimmung der ‘Solaris’-Akzessionen in beiden Instituten. Damit kann eine Sortenverwechslung ausgeschlossen werden und ist nicht ursächlich für die beobachtete Differenz. Als Begründung kommen Unterschiede im *Plasmopara*-Infektionsmaterial oder in den Kulturbedingungen der Reben in Betracht. Da ein Einfluss der Stilbene auf die Resistenzausprägung nicht nachweisbar war, fanden keine weiteren Untersuchungen in dieser Richtung statt.

Als eine weitere Resistenzantwort von ‘Solaris’ auf eine *Plasmopara*-Infektion konnten Gindro *et al.* (2003) induzierte Kalloseablagerungen an den Stomata in der Nähe von Infektionsstellen beobachten. Dadurch wurden diese verschlossen und können von weiteren Zoosporen nicht als Eintrittspforte in das Blatt verwendet werden. Der in Gindro *et al.* (2003) verwendete Kallose-Nachweis mit Anilinblau ist eine einfache Methode zur Identifikation solcher Strukturen. Jedoch waren keine Kalloseablagerungen an den Stomata im untersuchten, künstlich infizierten Blattmaterial zu beobachten. Dies gilt für ‘Solaris’, Gf.Ga-52-42 und ‘Müller Thurgau’, sowie für stichprobenartig ausgewählte Genotypen der Kreuzungspopulation. Ein Fehler in der Methodik kann ausgeschlossen werden, da auch am etablierten System des Agroscope Changins-Wädenswil der Nachweis von Kallose am eigenen Untersuchungsmaterial nicht möglich war, während dort durchgeführte Infektionen an der genetisch identischen ‘Solaris’ zur Kallosebildung führten. Auch hier sind abweichende Kulturbedingungen der Reben oder eine Divergenz im *Plasmopara*-Infektionsmaterial mögliche Erklärungen für die beobachteten Unterschiede. Da ein Nachweis von Kallose nicht möglich war, konnten auch keine entsprechenden Daten für eine QTL-Analyse erhoben werden.

4.3 Genetische Karte und QTL-Analysen

Das Erstellen genetischer Karten anhand einer Kreuzungspopulation ist eine gebräuchliche Vorgehensweise, um segregierende Merkmale auf dem Genom zu lokalisieren. Eine Auflistung der bisher untersuchten Kreuzungspopulationen bei Reben mit den daran

lokalisierten Merkmalen wird auf der Homepage des „Vitis International Variety Catalogue“ (VIVC; <http://www.vivc.de>) bereitgestellt.

In einem ersten Schritt wurde für die 265 Nachkommen umfassende Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x ‘Solaris’ eine genetische Basiskarte mit vier bis fünf SSR-Markern auf jeder der 19 Kopplungsgruppen (LGs) erstellt. Diese Minimalabdeckung des Genoms erlaubte QTL-Berechnungen mit den zu diesem Zeitpunkt vorliegenden phänotypischen Daten. Auf diesem Weg konnten in dieser ersten vorläufigen Karte bereits signifikante QTL auf den LGs 09 und 18 identifiziert werden. Somit war anhand der ersten Resultate eine zielgerichtete Ergänzung der Basiskarte mit ausgewählten SSR-Markern möglich. Da es sich bei dem QTL auf LG 18 um den bereits bekannten *Rpv3*-Locus handelt (siehe unten), lag der Fokus besonders auf dem neu identifizierten QTL der LG 09, der von ‘Solaris’ vererbt worden war und dessen Herkunft auf *V. amurensis* zurückgeht. Um den QTL einzugrenzen, wurden neue Locus-spezifische Marker entwickelt und kartiert. Die Entwicklung neuer SSR-Marker anhand der PN40024-Referenzgenomsequenz (Jaillon *et al.* 2007) hat sich hierfür als zielgerichtete und effiziente Methode bewährt. Neben den Locus-spezifischen Markern wurden für die Kartenerweiterung auch Marker gewählt, die an den Enden der LGs lokalisiert sind. Dadurch wurde die Genomabdeckung erhöht, um möglichst alle merkmalsrelevanten Bereiche bei den Analysen erfassen zu können. Die beschriebene referenzgenombasierte chromosomale Feinkartierung erwies sich letztlich als sehr effizient und erfolgreich. Über das Merkmal der *Plasmopara*-Resistenz hinaus bietet die entwickelte Karte eine gute Basis für Untersuchungen von weiteren, in dieser Population segregierenden, Merkmalen.

Die in dieser Karte erzielte Genomabdeckung entspricht der von ähnlich umfangreichen Karten (Moreira *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2009) und repräsentiert 66 % bis 77 % der Größe von genetischen Karten mit deutlich höheren Markerdichten (Di Gaspero *et al.* 2007; Doligez *et al.* 2006; Vezzulli *et al.* 2008; Welter *et al.* 2007).

In der Kreuzungspopulation Gf.Ga-52-42 x ‘Solaris’ konnten zwei Haupt-QTL für die *Plasmopara*-Resistenz identifiziert werden. Der starke QTL auf LG 18 wurde von Gf.Ga-52-42 vererbt und ist identisch mit dem in ‘Regent’ gefundenen (Fischer *et al.* 2004; Welter *et al.* 2007) und als *Rpv3* in ‘Bianca’ beschriebenen *Plasmopara*-Resistenzlocus (Bellin *et al.* 2009). Das resistenztragende Allel in Gf.Ga-52-42 stammt von ‘Villard Blanc’, der ebenfalls Vorfahre von ‘Bianca’ und ein Vollgeschwister von S.V. 12-417, einem Großelternanteil von ‘Regent’, ist. Als ursprünglicher *Rpv3*-Resistenzdonor wird eine *V. rupestris*-Akzession aus dem Mittleren Westen der USA vermutet (Casagrande *et al.* 2011). Aus Untersuchungen an ‘Bianca’ ist bekannt, dass die Resistenz mit der Bildung von

Nekrosen als Ergebnis einer lokalen hypersensitiven Reaktion (HR), einer signifikanten Reduktion des Mycelwachstums im Mesophyll und einer spärlichen Ausbildung von Sporangienträgern einhergeht (Bellin *et al.* 2009). Im Bereich des Locus befinden sich Resistenzgene mit TIR-NBS-LRR-Motiven und Proteine mit Ähnlichkeit zu LRR-Rezeptorkinasen. Bei einer rassenspezifischen Erkennung eines *P. viticola*-Isolats mit entsprechendem *Rpv3*-Avirulenzfaktor kommt es zu erhöhten Expressionsraten von *HSRI* (einem Marker für die HR), den Pathogen-induzierten Genen *PR-1* und *PR-2* (einer β -1,3 Glucanase), sowie der WRKY-Transkriptionsfaktoren *WRKY4* und *WRKY30* (Casagrande *et al.* 2011). Die durch den *Rpv3*-Locus vermittelte Resistenz ist rassenspezifisch, was durch den Resistenzbruch eines tschechischen *Plasmopara*-Isolates belegt werden konnte (Peressotti *et al.* 2010). Dies zeigt wie wichtig eine geeignete Strategie zur Pyramidierung verschiedener Resistenzquellen und -mechanismen in der Rebenzüchtung ist, um Sorten mit stabilen und dauerhaften Resistenzeigenschaften zu entwickeln.

Direkte Vergleiche von QTL-Ausprägungen eines Locus zwischen Kreuzungspopulationen sind aufgrund der vielfach unterschiedlichen genetischen Hintergründe und/oder verschiedenen Methoden zur Erfassung der Merkmalsausprägung meist nur sehr bedingt möglich. Der in diesen Untersuchungen für den *Rpv3*-Locus ermittelte LOD-Wert von 16,5 liegt im mittleren Bereich der für diesen Locus angegebenen LOD-Werte bei anderen Kreuzungspopulationen (Bellin *et al.* 2009; Fischer *et al.* 2004; Peressotti *et al.* 2010; Welter *et al.* 2007). Der Vergleich wird jedoch durch das Vorhandensein eines zweiten Haupt-QTL in dem untersuchten genetischen Material maßgeblich beeinflusst. So weist der *Rpv10*-Locus einen deutlich höheren genetischen Einfluss auf die Resistenzausprägung auf (vgl. Abbildung 14). Möglicherweise gibt es auf Grund der unterschiedlichen genetischen Hintergründe auch weitere Faktoren, die den Varianzanteil der beiden Loci beeinflussen. Im Hinblick auf die von Peressotti *et al.* (2010) beschriebene rassenspezifische Resistenz des *Rpv3*-Locus, ist nicht auszuschließen, dass ein Anteil der *Plasmopara*-Sporen in der Inokulationssuspension aus Rassen stammte, die die *Rpv3*-spezifische Resistenz überwunden haben. Dies würde zu einer reduzierten phänotypischen Varianz des *Rpv3*-Locus führen.

Der mit einem maximalen LOD-Wert von 48,8 sehr stark ausgeprägte QTL auf der LG 09 erklärt bis zu 50 % der phänotypischen Varianz. Dieser QTL wurde durch 'Solaris' vererbt und stammt ursprünglich von einer asiatischen Wildrebe der Art *Vitis amurensis*, welche 1936 in Russland für eine Kreuzung mit der *V. vinifera*-Sorte 'Seyanets Malengra' verwendet

wurde (<http://www.vivc.de> nach Ampelografija of the USSR 1955). Erste genetische Informationen über die *Plasmopara*-Resistenz bei *V. amurensis* sind mittlerweile beschrieben. In einer Kreuzungspopulation, die *V. rotundifolia* und *V. amurensis* im Stammbaum aufweist, wurden QTL auf den LG 01 und LG 06 lokalisiert (Moreira *et al.* 2011). Luo *et al.* (2001) konnten einen SCAR-Marker entwickeln, der mit der *Plasmopara*-Resistenz von in China heimischen Wildreben, inklusive *V. amurensis*, korreliert ist. Ein Abgleich der Primersequenz des Markers mit dem PN40024-Referenzgenom ergab, dass der Marker dort auf dem Chromosom 01 an der Position 10,9 Mb lokalisiert ist und somit nicht den *Rpv10*-Locus beschreibt. In einer *V. amurensis*-S1-Population konnte kürzlich der *Rpv8*-Resistenzlocus auf der LG 14 identifiziert werden, der eine vollständige Resistenz gegenüber *P. viticola* vermitteln soll (Blasi *et al.* 2011).

Auf der LG 09 wurde bereits der *Plasmopara*-Resistenzlocus *Rpv5* an der Kreuzungspopulation ‘Cabernet Sauvignon’ x *V. riparia* ‘Gloire de Montpellier’ identifiziert (Marguerit *et al.* 2009). Die beschriebenen QTLs für die Merkmale „Resistenzausprägung“ und „Sporangienzahl“ weisen sehr breite Konfidenzintervalle von mindestens 28,9 cM auf, welche auch den in dieser Arbeit identifizierten QTL-Bereich einschließen. Aufgrund der völlig unterschiedlichen Resistenzquellen Resistenzquellen (*V. riparia* ist ausschließlich im amerikanischen Raum, *V. amurensis* ausschließlich im asiatischen Raum beheimatet) war jedoch davon auszugehen, dass es sich um unterschiedliche Resistenzen handelt. Um dies genetisch zu belegen, wurde ‘Gloire de Montpellier’-DNA mit zwölf den QTL-Bereich flankierenden SSR-Markern überprüft (Tabelle 9). ‘Gloire de Montpellier’ weist die in ‘Solaris’ identifizierten resistenzkorrelierenden Allellängen nicht auf. Somit konnte gezeigt werden, dass sich der in diesen Untersuchungen identifizierte Resistenzlocus auf der LG 09 von dem durch Marguerit *et al.* (2009) identifizierten Resistenzlocus auf der gleichen LG unterscheidet. In dieser Untersuchung wurde u. a. auch die Sorte ‘Bronner’ mit den Markern getestet. Sie weist im QTL-Bereich identische allelische Muster wie ‘Solaris’ auf. Damit könnte der Resistenzlocus dem in einer ‘Bronner’-Nachkommenschaft identifizierten QTL entsprechen, der in einer Kurzbeschreibung Erwähnung findet und dort 52 % der phänotypischen Variation erklären soll (Blasi *et al.* 2010). Der in dieser Arbeit genetisch lokalisierte und in der Feinkartierung auf einen Bereich von 0,8 cM eingeschränkte Resistenzlocus wird im Folgenden als *Rpv10* bezeichnet. Dabei war die Feinkartierung letztlich durch die in diesem Bereich zur Verfügung stehenden SSRs limitiert. Marker für alle SSRs im relevanten Bereich waren in einer letzten Kartierungsrunde entwickelt und getestet worden. Leider stellten sich diese als monomorph heraus oder amplifizierten unter den

gewählten PCR-Bedingungen nicht. Für eine feinere Kartierung wären daher andere Markertypen wie beispielsweise SNPs („single nucleotide polymorphism“) zu verwenden. SNPs stellen die am häufigsten beobachteten genetischen Unterschiede in verschiedenen Arten dar (Vezzulli *et al.* 2008) und liegen sicherlich auch im QTL-Bereich vor. Für deren Entwicklung müssen jedoch die DNA-Sequenzen des Locus in den Elternsorten bekannt sein. Diese Sequenzierungsarbeiten waren im Rahmen des Projektes nicht mehr möglich.

Da eine weitere Feinkartierung nicht, wie ursprünglich erwartet, durch die zur Verfügung stehenden Rekombinanten limitiert wurde, konnten die bei der Untersuchung der ergänzenden 2700 Nachkommen identifizierten Kandidaten mit Rekombination in diesem Bereich keine weiteren Erkenntnisse liefern. Sollten jedoch neue molekulare Marker verfügbar werden, ständen für die Untersuchungen weitere 28 Genotypen mit Rekombinationspunkt im Bereich des *Rpv10*-Locus zur Verfügung.

Neben den beiden starken QTL konnte in den MQM-Berechnungen ein schwacher QTL identifiziert werden, der lediglich 3.0 % der phänotypischen Varianz erklärt. Ein ebenfalls schwacher QTL an dieser Position der LG 05 wurde bereits durch Fischer *et al.* (2004) beschrieben. Diesem Locus konnte ein an der hypersensitiven Reaktion beteiligtes Ca²⁺-Bindeprotein zugeordnet werden (Salmaso *et al.* 2008). Obwohl der Bereich in den beschreibenden Kreuzungspopulationen nur einen geringen Einfluss auf die Ausprägung der Widerstandsfähigkeit besitzt und deshalb für die Resistenzzüchtung von eher untergeordnetem Interesse ist, wird dieser Locus aufgrund der wiederholten Identifizierung an verschiedenen Kreuzungspopulationen im folgenden als *Rpv11* bezeichnet.

Auf der väterlichen ‘Solaris’-Karte konnten zudem schwache QTL auf den LGs 03 im IM und 18 im MQM identifiziert werden, welche die LG-spezifischen Signifikanzgrenzen zwar übersteigen, in der integrierten Karte und bei der jeweils anderen Analyseverfahren jedoch nicht auftraten. Da es sich bei der Position des QTL auf der LG 18 um einen randständigen Marker handelt und die QTLs nur einmalig auftraten, scheint es sich dabei um falsch positive Ereignisse (Typ I Fehler) zu handeln (Jansen 1994).

4.4 Abgleich mit den veröffentlichten Genomsequenzen

In der Genomsequenz der *V. vinifera*-Sorte ‘Pinot Noir’ wurden von Velasco *et al.* (2007) Resistenzgene vorhergesagt, davon 37 RGAs auf der LG 09. Die Hauptgruppe umfasst 19 Resistenzgene mit CC-NBS-LRR-Motiv und befindet sich innerhalb der ersten sechs Mega-

basen. Damit befindet sich das größte CC-NBS-LRR-Cluster des Genoms im Umfeld des in dieser Arbeit gefundenen *Rpv10*-Locus. NBS-LRR-Proteine ermöglichen der Pflanze die Anwesenheit von Effektoren zu erkennen, die durch das Pathogen in die Pflanzenzelle eingeschleust werden, um die Nichtwirtsresistenz zu inhibieren. Durch die Effektorerkennung wird eine entsprechende Abwehrreaktion der Wirtsresistenz ausgelöst (Chisholm *et al.* 2006). Zudem gibt es nach Velasco *et al.* (2007) in 'Pinot Noir' homologe Sequenzbereiche zu dem pathogen-assoziierten Protein PDF2 und in vier Fällen zu dem nichtwirtsresistenz-assoziierten *PEN3*, wobei sich drei davon im weiteren Umfeld des QTL befinden.

Die hohe Anzahl von NBS-LRRs in dieser Region wird auch durch das PN40024-Referenzgenom bestätigt (siehe 3.7 und Abbildung 15). Durch das Hinzufügen neu entwickelter Locus-spezifischer SSR-Marker konnte der QTL auf einen relativ kleinen Bereich von 79 kb zwischen den beiden flankierenden Markern GF09-65 und GF09-47 bezogen auf das PN40024-Referenzgenom eingeschränkt werden. Dieser Sequenzabschnitt beinhaltet lediglich ein RGA vom NBS-LRR-Typ mit Homologie zu einem in *V. riparia* identifizierten Protein.

Weitere in diesem Sequenzabschnitt annotierte Proteine haben eine bekannte Funktion in der Pathogenabwehr. Nahe des zentralen SSR-Markers GF18-46 befindet sich ein Ethylen-sensitiver Transkriptionsfaktor (ERF). Das gasförmige Ethylen reguliert verschiedene physiologische und wachstumsrelevante Prozesse und beeinflusst auch die Resistenzreaktion bei Schädlingsbefall. Beobachtungen in verschiedenen Pflanzen-Pathogen-Interaktionen zeigen, dass Ethylen dabei sowohl resistenzsteigernd als auch befallsfördernd wirken kann (van Loon *et al.* 2006a). ERF-Transkriptionsfaktoren bewirken eine direkte Expressionsregulation von PR-Genen („pathogenesis-related“) über die bevorzugte Bindung mit der GCC-Box von PR-Gen-Promotoren. Dabei scheinen diese Transkriptionsfaktoren in der Lage zu sein, die durch eine Infektion ausgelösten Ethylen-, Jasmonsäure- und Salicylsäuresignalwege zu integrieren und die Abwehrreaktion entsprechend zu modulieren (Xu *et al.* 2011).

Die Ankyrin-Domäne ist ein funktional essentieller Bestandteil des NPR1-Gens („non-expressor of pathogenesis-related genes 1“), welches als positiver Regulator von Salicylsäuresensitiven PR-Genen in der systemischen Resistenz von *Arabidopsis thaliana* agiert (Cao *et al.* 1997; Durrant & Dong 2004; Koornneef & Pieterse 2008). Auch andere resistenz-assoziierte Gene, wie das *Star*-Gen (*Solanum tuberosum* ankyrin repeat) der Kartoffel (Wu *et al.* 2009) oder die GBP 1- und 2-Gene („glucanohydrolase binding proteins“) in *Nicotiana plumbaginifolia* (Wirdnam *et al.* 2004), weisen das Ankyrin-Motiv auf.

PR-Proteine mit struktureller Ähnlichkeit zu Ribonucleasen wurden als Reaktion auf pilzliche Elizitoren in mehreren Pflanzen nachgewiesen (Poupard *et al.* 2003; Rushton *et al.* 1996).

Eine Wirksamkeit gegen Viren, durch das spezifische Zerschneiden viraler RNA und eine antimikrobielle Wirksamkeit gegen einen Oomyceten konnte für Vertreter dieser PR-Protein-Klasse (PR-10) nachgewiesen werden (Park *et al.* 2004). In der Rebe kommt es durch eine *P. viticola*-Infektion zur Induktion ('Riesling') oder verstärkten Expression ('Gloire de Montpellier') eines PR-10-Proteins (Kortekamp 2006).

Die zwei verbleibenden Gene (RuBisCO-Untereinheit, Protein mit VHS-Domäne), die in diesem Bereich annotiert wurden, scheinen rein funktionell keinen unmittelbaren Einfluss auf die Pathogenabwehr zu haben. Dies trifft ebenso auf das aufgeführte Aquaporin TIP2-1 zu, für welches jedoch durch Wu *et al.* (2010) ein Anstieg in der Expression nach erfolgter *Plasmopara*-Infektion gezeigt werden konnte. Es wurde jedoch gezeigt, dass TIP-analoge Aquaporine neben Wasser auch das chemisch analoge Hydrogenperoxid (H₂O₂) transportieren können, welches eine wichtige Rolle bei der Stressantwort spielt (Maurel 2007). Eine indirekte Beteiligung an Abwehrmechanismen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Für die bislang uncharakterisierten Gene kann keine funktionelle Aussage getroffen werden. Somit konnten mit dem NBS-LRR, dem ERF, dem Protein mit Ankyrin-Domäne und der mutmaßlichen Ribonuclease vier potentielle Kandidatengene für die *Rpv10*-Region auf dem Referenzgenom identifiziert werden. Trotz der hohen Anzahl an Resistenz-assoziierten Genen besitzt der für das Referenzgenom sequenzierte 'Pinot Noir' keine *Plasmopara*-Resistenz, weshalb davon auszugehen ist, dass gerade in diesen Bereichen ein hoher Grad an allelischer Diversität herrscht (Hvarleva *et al.* 2009). Dennoch unterstützt die hohe Anzahl an resistenz-assoziierten Genen die potentielle Bedeutung dieser Region für die Ausprägung von Resistenzen.

4.5 Abstammungsanalysen

Die durchgeführten Markeranalysen ergaben, dass der bisher angenommene Stammbaum der Sorte 'Solaris' unzutreffend ist. Es konnte belegt werden, dass es sich bei 'Severnyi' und 'Muscat Ottonel' um die wahren Eltern des Pollendonors (Geisenheim 6493) handelt, mit dem 'Merzling' gekreuzt wurde. Die Identität des für die DNA-Extraktion verwendeten 'Severnyi'-Stocks wurde ampelographisch überprüft und bestätigt (Frau Dr. E. Maul, pers. Mitteilung). Anhand der Markerdaten konnte gezeigt werden, dass es sich bei 'Zarya Severa' und 'Severnyi' um Vollgeschwister handelt. Interessanterweise besitzt 'Zarya Severa', welche als *Plasmopara*-resistent beschrieben ist (Ampelografija of the USSR 1954), nicht alle der resistenzkorrelierten Allellängen von *Rpv10*. Die Auswertung von 12 flankierenden Markern

ergab, dass die korrelierenden Allellängen bei vier nah lokalisierten Markern (GF09-44, GF09-61, GF09-47 und GF09-48) in ‘Zarya Severa’ auftreten, aber bei den übrigen acht Marken, inklusive dem zentralen GF09-46, fehlen. Für die Marker GF09-44 und GF09-47 konnte bei der Untersuchung der genetischen Ressourcen (Kapitel 3.10) festgestellt werden, dass die resistenzkorrelierte Allellänge zudem gehäuft bei *Rpv10*-Allelen vorkommt. GF09-46 stellte sich dagegen als sehr zuverlässiger Indikator für den *Rpv10*-Locus heraus. Dadurch ist es sehr unwahrscheinlich, dass die beschriebenen *Plasmopara*-Resistenzen von ‘Severnyi’ und ‘Zarya Severa’ identisch sind. Dies wiederum bedeutet, dass ‘Zarya Severa’ einen anderen Resistenzlocus von *V. amurensis* geerbt hat, der in einer der Kreuzungen nicht auf ‘Solaris’ weitervererbt wurde. Die von Boso & Kassemeyer (2008) beobachtete Reduktion der *Plasmopara*-Resistenz bei ‘Solaris’ im Vergleich zu *V. amurensis* unterstützt die Annahme, dass es zu einem Verlust weiterer Resistenzfaktoren gekommen ist. Bei diesem zweiten Locus könne es sich eventuell um den kürzlich in einer *V. amurensis*-Selbstungspopulation identifizierten *Rpv8*-Locus auf der LG 14 handeln (Blasi *et al.* 2011).

‘Merzling’ als mütterlicher Elternteil von ‘Solaris’ besitzt ebenfalls eine von ‘Seyval’ geerbte hohe Widerstandsfähigkeit gegen den Falschen Mehltau (Becker 2005), die jedoch nachweislich nicht vom *Rpv3*-Locus stammt. Da der schwache QTL auf LG 05 (*Rpv11*) kaum die ausschließliche Erklärung für den hohen Resistenzgrad von ‘Merzling’ sein dürfte, ist davon auszugehen, dass ‘Merzling’ eine weitere Resistenz aufweist, die jedoch nicht an ‘Solaris’ weitergegeben wurde. Der *Rpv11*-Locus, der von ‘Solaris’ in die Kreuzungspopulation eingebracht wurde, könnte den verfügbaren Markerinformationen zufolge sowohl von ‘Severnyi’, als auch von ‘Merzling’ stammen. Beide Sorten besitzen die resistenzkorrelierende Allellänge beim nächstgelegenen Marker VCHR05C.

4.6 Genetische Identifizierung von *Rpv10*⁺-Ressourcen

Umfangreiche Charakterisierungen von genetischen Ressourcen erlauben einen zielgerichteten und flexiblen Einsatz der verfügbaren genetischen Vielfalt im Zuchtverlauf. Um Sorten und Zuchtstämme, die als *Rpv10*⁺-Resistenzquellen eingesetzt werden können, zu identifizieren, wurde ein Set von 94 Genotypen mit *V. amurensis*-Abstammung untersucht. Die dabei als *Rpv10*-Resistenzträger identifizierten 22 Genotypen bilden ein breites Auswahlpektrum für die Introgression des *Rpv10*-Locus in das Zuchtmaterial. Für die letztliche Wahl der im Zuchtverlauf eingesetzten *Rpv10*⁺-Kreuzungseltern können nun weitere züchterisch interessante Aspekte einbezogen werden. Züchterisch am interessantesten sind sicherlich

Genotypen, die aus mehreren Rückkreuzungen hervorgegangen sind und damit bereits einen erhöhten genetischen *V. vinifera*-Anteil besitzen. Da bei 15 der identifizierten Genotypen der Locus über ‘Severnyi’ vererbt wurde, könnten besonders Sorten wie ‘Doncsak’ und ‘Olimijec’ interessante Alternativen zu den ‘Severnyi’-Nachkommen als Resistenzdonor darstellen (siehe Tabelle 11).

Zudem lieferte diese Untersuchung wichtige Erkenntnisse über die Anwendbarkeit der gefundenen resistenzgekoppelten molekularen Marker in der Züchtung. Außerhalb einer definierten Kreuzungspopulation kann die resistenzkorrelierende Fragmentlänge auch bei Allelen auftreten, die den Resistenzlocus nicht tragen. Um einschätzen zu können, wie oft dies bei den einzelnen Markern der Fall ist, sind Untersuchungen an vielen Sorten und Zuchtstämmen mit mehreren resistenzgekoppelten Markern notwendig. Eine Identifikation des locustragenden Allels kann dabei über das durchgängige Vorhandensein der resistenzkorrelierenden Fragmentlängen aller getesteten Marker erfolgen. Hierbei können Rekombinationspunkte zwischen den Markern die Bewertung erschweren, wie in dieser Arbeit beispielsweise bei Lednice C 62 beobachtet. In solchen Fällen müsste eine genaue phänotypische Überprüfung klären, ob die Resistenz übertragen wurde und eine mögliche Beteiligung von weiteren *Plasmopara*-Resistenzloci ausgeschlossen werden kann. Bei dieser Betrachtung lassen sich ausschließlich Genotypen ermitteln, die das Allel der ursprünglichen *V. amurensis*-Quelle von ‘Solaris’ aufweisen. Dies schließt nicht aus, dass es weitere *V. amurensis* Wildartakzessionen oder deren Nachkommen gibt, die trotz abweichender Fragmentlängen der SSR-Marker in dieser Region ähnliche oder identische Resistenzeigenschaften besitzen. Vor allem evolutionäre Distanz zwischen den Wildarten könnten zu Unterschieden in den SSR-Markern geführt haben. Die Identifikation des/der Resistenzgene und die Entwicklung von genspezifischen Markern wäre hierfür vorteilhaft.

Für die Anwendung in der Züchtung eignen sich besonders Marker, die eng mit dem Merkmal gekoppelt sind und deren resistenzkorrelierte Fragmentlänge überwiegend oder ausschließlich auf dem locustragenden Allel vorkommt. Im untersuchten Set weist der zentral im QTL gelegene SSR-Marker GF09-46 beide Eigenschaften auf und ist damit besonders für die Anwendung im Rahmen der markergestützten Selektion geeignet. Um das Ergebnis abzusichern, ist es jedoch ratsam zusätzliche geeignete Marker für die Identifikation eines Locus zu verwenden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse empfiehlt sich im Fall des *Rpv10*-Locus die Kombination der drei SSR-Marker GF09-11, GF09-46 und GF09-48 zu verwenden. Obwohl die beiden Marker GF09-11 und GF09-48 eine etwas geringere Merkmalskopplung

aufweisen als die direkt flankierenden Marker, erlauben sie aufgrund des deutlich selteneren Auftretens der resistenzkorrelierenden Allellänge auf weiteren Allelen eine bessere Identifikation.

Mit den identifizierten *Rpv10*⁺-Genotypen und der empfohlenen multiplextauglichen Markerkombination steht der Zuchtpraxis nun ein direkt anwendbares und zuverlässiges Werkzeug zur Verfügung um den neu identifizierten *Rpv10*-Resistenzlocus effektiv in das Zuchtprogramm zu integrieren.

4.7 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte ein neuer Resistenzlocus (*Rpv10*) gegen den Falschen Mehltau für die markergestützte Resistenzzüchtung von Reben erschlossen werden. Der *Rpv10*-Resistenzlocus stammt ursprünglich aus einem *V. amurensis*-Genotyp und wurde über ‘Severnyi’ und einen Genotyp der Kreuzungspopulation Geisenheim 6493 an die Rebsorte ‘Solaris’ (‘Merzling’ x (‘Severnyi’ x ‘Muskat Ottonel’)) vererbt. In einer Kreuzungspopulation mit 265 Nachkommen zwischen Gf.Ga.52-42 (‘Bacchus’ x ‘Villard Blanc’) und ‘Solaris’ konnten durch QTL-Analysen die *Plasmopara*-Resistenzloci *Rpv3* und *Rpv10* kartiert werden. Individuen der Population, die beide Loci geerbt haben, weisen höhere Resistenzgrade als die Elternsorten auf, was auf einen additiven Effekt hinweist und damit die Eignung dieser beiden Loci für die Resistenzpyramidisierung belegt. Ein dritter, jedoch deutlich schwächer ausgeprägter Locus (*Rpv11*) wurde auf der LG 05 identifiziert.

Die Entwicklung neuer Locus-spezifischer SSR-Marker ermöglichte eine Feinkartierung des *Rpv10*-Locus auf ein Konfidenzintervall von nur 0,5 cM in der MQM-Analyse. Dabei wurde die Auflösungsgrenze der genetischen Kartierung mit SSR-Markern unter Verwendung des Referenzgenoms erreicht. Der Bereich zwischen den QTL-flankierenden Markern entspricht einem Sequenzabschnitt von 79 kb auf der PN40024-Referenzgenomsequenz, der auf Resistenz-assoziierte Annotationen untersucht wurde. Ein RGA mit NBS-LRR-Motiv, ein Ethylen-sensitiver Transkriptionsfaktor, ein Protein mit Ankyrin-Domäne sowie ein mutmaßliche Ribonuclease wurden als potentielle Kandidatengene identifiziert. Weitere Details können nur durch eine Sequenzierung des *Rpv10*-Genomabschnitts aufgeklärt werden. Anhand der Sequenzunterschiede könnten SNP-Marker abgeleitet werden, um eine höhere Kartenauflösung zu erzielen. Die Sequenzen erlauben zudem den Abgleich der Kandidatengene zwischen anfälligem und resistentem Genotyp und eine mögliche Identifikation weiterer, nur im resistenten Genotyp auftretender, Resistenzkandidatengene.

Eine abschließende Identifikation des/der für die Resistenzausprägung verantwortlichen Gens/e könnte über eine funktionelle Analyse erfolgen

Die eng korrelierten SSR-Marker wurden verwendet, um den *Rpv10*-Locus in Genotypen mit *V. amurensis* im Stammbaum zu identifizieren. Die 22 dabei identifizierten Sorten und Zuchtstämme stehen als *Rpv10*-Resistenzquellen für die Züchtung zur Verfügung. Bei dieser Untersuchung zeigte sich auch, welche Marker sich für die MAS am besten eignen. Durch den Einsatz dieser Marker kann der *Rpv10*-Locus in der Züchtung zur Pyramidisierung mit weiteren *Plasmopara*-Resistenzloci eingesetzt werden, um neue Sorten mit breiten und dauerhaften Resistenz-Eigenschaften zu entwickeln.

Literaturverzeichnis

Adam-Blondon, A. F., C. Roux, D. Claux, G. Butterlin, D. Merdinoglu und P. This. 2004. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theor Appl Genet*, 109(5): 1017-1027.

Allewelt, G. und J. V. Possingham. 1988. Progress in grapevine breeding. *Theor Appl Genet*, 75(5): 669-673.

Ampelografija of the USSR. 1954. Pishchepromizdat, Moscow.

Ampelografija of the USSR. 1955. Pishchepromizdat, Moscow.

Becker, H. 1981. Erste Ergebnisse der Züchtung interspezifischer Ertragsorten mit der Erbmasse der *Vitis amurensis* Ruprecht in Geisenheim. *Deutsches Weinbau Jahrbuch*,(32): 25-35.

Becker, N. 1996. Pilzwiderstandsfähige Rebenneuzuchten des Staatlichen Weinbauinstituts Freiburg. *Der Badische Winzer*, 7: 25-28, 8: 27-30, 9: 18-20.

Becker, N. Zwei pilzresistente Weißweinsorten für den ökologischen Weinbau. <http://www.landwirtschaft-bw.info> . 26-8-2005. 11-1-2011.

Bellin, D., E. Peressott, D. Merdinoglu, S. Wiedemann-Merdinoglu, A. F. Adam-Blondon, G. Cipriani, M. Morgante, R. Testolin und G. Di Gaspero. 2009. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theor Appl Genet*, 120(1): 163-176.

Berkelmann-Löhnertz, B., Heibertshausen, D., Baus-Reichel, O., Hofmann, U., und Kauer, R. Ohne Kupfer geht es nicht – Status quo im ökologischen Weinbau nach vier Jahren BÖL-Verbundprojekt. Fachgespräch „Bedeutung von Kupfer für den Pflanzenschutz, insbesondere für den Ökologischen Landbau - Reduktions- und Ersatzstrategien" . 2008. Berlin. 29-1-2008.

Blasi, P., Schnee, S., Wiedemann-Merdinoglu, S., Prado, E., Godard, S., Coste, P., Onimus, C., Gindro, K., Schneider, C., Viret, O., und Merdinoglu, D. Genetic analysis of the resistance to downy and powdery mildews derived from cultivar Bronner. 6th International Workshop of grapevine downy and powdery mildew . 2010. 4-7-2010.

Blasi, P., S. Blanc, S. Wiedemann-Merdinoglu, E. Prado, E. Rühl, P. Mestre und D. Merdinoglu. 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(1): 43-53.

Bleyer, G. 2008. Die Peronospora-Prognose wird immer wieder verbessert. *Der Badische Winzer*, 4: 23-26.

Boso, S. und H. H. Kassemeyer. 2008. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. *Vitis*, 47(1): 39-49.

- Boso, S., M. C. Martinez, S. Unger und H. H. Kassemeyer. 2006. Evaluation of foliar resistance to downy mildew in different cv. Albarino clones. *Vitis*, 45(1): 23-27.
- Bowers, J. E., G. S. Dangl und C. P. Meredith. 1999. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am J Enol Viticult*, 50(3): 243-246.
- Bowers, J. E., G. S. Dangl, R. Vignani und C. P. Meredith. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39(4): 628-633.
- Brown, M. V., J. N. Moore, P. Fenn und R. W. McNew. 1999. Comparison of Leaf Disk, Greenhouse, and Field Screening Procedures for Evaluation of Grape Seedlings for Downy Mildew Resistance. *Hortscience*, 34(2): 331-333.
- Burrano, S. 2000. The life-cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine. *Mycologist*, 14(4): 179-182.
- Campbell, C. 2004. *Phylloxera : how wine was saved for the world*. HarperCollins, London.
- Cao, H., J. Glazebrook, J. D. Clarke, S. Volko und X. Dong. 1997. The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88(1): 57-63.
- Casagrande, K., L. Falginella, S. Castellarin, R. Testolin und G. Di Gaspero. 2011. Defence responses in *Rpv3*-dependent resistance to grapevine downy mildew. *Planta*, doi: 10.1007/s00425-011-1461-5: 1-13.
- Chisholm, S. T., G. Coaker, B. Day und B. J. Staskawicz. 2006. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, 124(4): 803-814.
- Chong, J., G. Le Henaff, C. Bertsch und B. Walter. 2008. Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. *Plant Physiol Bioch*, 46(4): 469-481.
- Churchill, G. A. und R. W. Doerge. 1994. Empirical Threshold Values for Quantitative Trait Mapping. *Genetics*, 138(3): 963-971.
- Cipriani, G., M. Marrazzo, G. Di Gaspero, A. Pfeiffer, M. Morgante und R. Testolin. 2008. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping. *BMC Plant Biol*, 8(1): 127.
- Coleman, C., D. Copetti, G. Cipriani, S. Hoffman, P. Kozman, L. Kovacs, M. Morgante, R. Testolin und G. Di Gaspero. 2009. The powdery mildew resistance gene REN1 co-segregates with an NBS-LRR gene cluster in two Central Asian grapevines. *Bmc Genetics*, 10(89): 1-20.
- Costantini, L., F. M. Moreira, E. Zyprians, J. M. Martínez-Zapater und M. S. Grando. 2009. Molecular Maps, QTL Mapping & Association Mapping In Grapevine in Roubelakis-Angelakis, K. A. (ed) *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Springer Netherlands.
- Creasy, G. L. and L. L. Creasy. 2009. Grapevine pests, diseases and disorders in Creasy, G. L. and L. L. Creasy (eds) *Grapes*. CABI, Wallingford.

- Csizmazia, J. 1993. VIKTOR, Perle von Zala x Kazatshkah - eine Polyvitis-Hybride. *Deutsches Weinbau Jahrbuch* 1993, 63-66.
- Dangl, J. L. und J. D. G. Jones. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839): 826-833.
- DeGlene-Benbrahim, L., S. Wiedemann-Merdinoglu, D. Merdinoglu und B. Walter. 2010. Evaluation of Downy Mildew Resistance in Grapevine by Leaf Disc Bioassay with In Vitro- and Greenhouse-Grown Plants. *Am J Enol Viticult*, 61(4): 521-528.
- DeYoung, B. J. und R. W. Innes. 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunol*, 7(12): 1243-1249.
- Di Gaspero, G. und G. Cipriani. 2003. Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. *Mol Genet Genomics*, 269(5): 612-623.
- Di Gaspero, G., G. Cipriani, A. F. Adam-Blondon und R. Testolin. 2007. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates. *Theor Appl Genet*, 114(7): 1249-1263.
- Di Gaspero, G., G. Cipriani, M. T. Marrazzo, D. Andreetta, M. J. P. Castro, E. Peterlunger und R. Testolin. 2005. Isolation of (AC)n-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. *Mol Breeding*, 15(1): 11-20.
- Di Gaspero, G., D. Copetti, C. Coleman, S. Castellarin, R. Eibach, P. Kozma, T. Lacombe, G. Gambetta, A. Zvyagin, P. Cindric, L. Kovacs, M. Morgante und R. Testolin. 2011. Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *Theor Appl Genet*, doi: 10.1007/s00122-011-1703-8: 1-10.
- Dixon, R. A. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839): 843-847.
- Doerge, R. W. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev Genet*, 3(1): 43-52.
- Doligez, A., A. F. Adam-Blondon, G. Cipriani, V. Laucou, D. Merdinoglu, C. P. Meredith, S. Riaz, C. Roux, P. This und G. Di Gaspero. 2006. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. *Theor Appl Genet*, 113(3): 369-382.
- Donald, T. M., F. Pellerone, A. F. Adam-Blondon, A. Bouquet, M. R. Thomas und I. B. Dry. 2002. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theor Appl Genet*, 104(4): 610-618.
- Durrant, W. E. und X. Dong. 2004. Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 42: 185-209.
- Eibach, R., H. Diehl und G. Alleweldt. 1989. Investigations on the heritability of resistance to *Oidium tuckeri*, *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea* in grapes. *Vitis*, 28: 209-228.
- Eibach, R., L. Hausmann und R. Töpfer. 2011. Use of genetic diversity for grapevine resistance breeding. *Mitt Klosterneuburg*, 60: 332-337.

Eibach, R., E. Zyprian, L. Welter und R. Töpfer. 2007. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis*, 46(3): 120-124.

Europäische Kommission. Study on the use of varieties of interspecific vines. http://ec.europa.eu/agriculture/markets/wine/studies/vine_en.pdf Contract No AGR 3088. 30-12-2002.

Eurostat. The use of plant protection products in the European Union. <http://epp.eurostat.ec.europa.eu>. 5-2-2007.

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

Fischer, B. M., I. Salakhutdinov, M. Akkurt, R. Eibach, K. J. Edwards, R. Töpfer und E. M. Zyprian. 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theor Appl Genet*, 108(3): 501-515.

Flor, H. H. 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu Rev Phytopathol*, 9(1): 275-296.

Flors, V., J. Ton, G. Jakab und B. Mauch-Mani. 2005. Abscisic Acid and Callose: Team Players in Defence Against Pathogens? *J Phytopathol*, 153(7-8): 377-383.

Gindro, K., R. Pezet und O. Viret. 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.

Gindro, K., J. L. Spring, R. Pezet, H. Richter und O. Viret. 2006. Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grapevine cultivars resistant to *Plasmopara viticola*. *Vitis*, 45(4): 191-196.

Gobbin, D., G. Bleyer, S. Keil, H. H. Kassemeyer und C. Gessler. 2006. Evidence for sporangial dispersal leading to a single infection event and a sudden high incidence of grapevine downy mildew. *Plant Pathol*, 56(5): 843-847.

Gobbin, D., I. Pertot und C. Gessler. 2003. Identification of microsatellite markers for *Plasmopara viticola* and establishment of high throughput method for SSR analysis. *Eur J Plant Pathol*, 109(2): 153-164.

Gobbin, Davide. Redefining *Plasmopara viticola* epidemiological cycle by molecular genetics. 2004. Swiss Federal Institute of Technology, Zürich. Dissertation.

Gomès, E. and P. Coutos-Thévenot. 2009. Molecular Aspects of Grapevine-Pathogenic Fungi Interactions in Roubelakis-Angelakis, K. A. (ed) *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Springer Netherlands, Dordrecht.

Grattapaglia, D. und R. Sederoff. 1994. Genetic-Linkage Maps of Eucalyptus-Grandis and Eucalyptus-Urophylla Using A Pseudo-Testcross - Mapping Strategy and Rapd Markers. *Genetics*, 137(4): 1121-1137.

Groß, Jürgen. Tests for Normality. [R package version 1.0]. 8-2-2006.

- Hammerschmidt, R. 1999. PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? *Annu Rev Phytopathol*, 37(22): 285-306.
- Hardham, A. R. 2007. Cell Biology of Fungal and Oomycete Infection of Plants in Howard, R. J. and N. A. R. Gow (eds) *Biology of the Fungal Cell*. Springer, Berlin Heidelberg NewYork.
- Heath, M. C. 2000a. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol*, 44(3): 321-334.
- Heath, M. C. 2000b. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol*, 3(4): 315-319.
- Hillebrand, W., H. Lott, Pfaff and F. 2003. *Taschenbuch der Rebsorten*, 13 edn. Fraund, Mainz, Germany.
- Hoffmann, S., Cindric, P., und Kozma, P. Breeding resistente cultivars to downy and powdery mildew.
http://www.oiv2007.hu/documents/viticulture/314_breeding_resistante_cultivars_to_1_.pdf .
2007. Paris; France, Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV). 27-9-2011.
- Hoffmann, S., G. Di Gaspero, L. Kovács, S. Howard, E. Kiss, Z. Galbács, R. Testolin und P. Kozma. 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine 'Kishmish vatkana' is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *Theor Appl Genet*, 116(3): 427-438.
- Hulbert, S. H., T. W. Ilott, E. J. Legg, S. E. Lincoln, E. S. Lander und R. W. Michelmore. 1988. Genetic analysis of the fungus *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. *Genetics*, 120(4): 947-958.
- Hvarleva, T., A. Bakalova, K. Rusanov, G. Diakova, I. Ilieva, A. Atanassov und I. Atanassov. 2009. Toward Marker Assisted Selection for Fungal Disease Resistance in Grapevine. *Biotechnol Biotec Eq*, 23(4): 1431-1435.
- Ingle, R. A., M. Carstens und K. J. Denby. 2006. PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *Bioessays*, 28(9): 880-889.
- Jaillon, O., J. M. Aury, B. Noel, A. Policriti, C. Clepet, A. Casagrande, N. Choisne, S. Aubourg, N. Vitulo, C. Jubin, A. Vezzi, F. Legeai, P. Hugueneu, C. Dasilva, D. Horner, E. Mica, D. Jublot, J. Poulain, C. Bruyere, A. Billault, B. Segurens, M. Gouyvenoux, E. Ugarte, F. Cattonaro, V. Anthouard, V. Vico, C. Del Fabbro, M. Alaux, G. Di Gaspero, V. Dumas, N. Felice, S. Paillard, I. Juman, M. Moroldo, S. Scalabrin, A. Canaguier, I. Le Clainche, G. Malacrida, E. Durand, G. Pesole, V. Laucou, P. Chatelet, D. Merdinoglu, M. Delledonne, M. Pezzotti, A. Lecharny, C. Scarpelli, F. Artiguenave, M. E. Pe, G. Valle, M. Morgante, M. Caboche, A. F. Adam-Blondon, J. Weissenbach, F. Quetier und P. Wincker. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449(7161): 463-468.
- Jansen, R. C. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics*, 135(1): 205-211.
- Jansen, R. C. 1994. Controlling the Type-I and Type-II Errors in Mapping Quantitative Trait Loci. *Genetics*, 138(3): 871-881.

- Jansen, R. C. und P. Stam. 1994. High-Resolution of Quantitative Traits Into Multiple Loci Via Interval Mapping. *Genetics*, 136(4): 1447-1455.
- Jones, D. A. und D. Takemoto. 2004. Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Curr Opin Immunol*, 16(1): 48-62.
- Jürges, G., H. H. Kassemeyer, M. Dürrenberger, M. Düggelin und P. Nick. 2009. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biol*, 11(6): 886-898.
- Kassemeyer, H. H. 2008. So wächst die Rebenperonospora. *Der Badische Winzer*, 5: 28-30.
- Kiefer, B., M. Riemann, C. Buche, H. H. Kassemeyer und P. Nick. 2002. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta*, 215(3): 387-393.
- Király, L., B. Barna und Z. Király. 2007. Plant Resistance to Pathogen Infection: Forms and Mechanisms of Innate and Acquired Resistance. *J Phytopathol*, 155(7-8): 385-396.
- Kobayashi, Y., M. Yamada, I. Kobayashi und H. Kunoh. 1997. Actin Microfilaments are Required for the Expression of Nonhost Resistance in Higher Plants. *Plant Cell Physiol*, 38(6): 725-733.
- Koornneef, A. und C. M. J. Pieterse. 2008. Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiol*, 146(3): 839-844.
- Kortekamp, A. 2006. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiol Bioch*, 44(1): 58-67.
- Kortekamp, A., L. Welter, S. Vogt, A. Knoll, F. Schwander, R. Töpfer und E. Zyprian. 2008. Identification, isolation and characterization of a CC-NBS-LRR candidate disease resistance gene family in grapevine. *Mol Breeding*, 22(3): 421-432.
- Kortekamp, A., R. Wind und E. Zyprian. 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., R. Wind und E. Zyprian. 1998. Investigation of the interaction of *Plasmopara viticola* with susceptible and resistant grapevine cultivars. *J Plant Dis Protect*, 105(5): 475-488.
- Kortekamp, A. und E. Zyprian. 1999. Leaf hairs as a basic protective barrier against downy mildew of grape. *J Phytopathol*, 147(7-8): 453-459.
- Kozma, P. jr. 2000. Winegrape breeding for fungus disease resistance. *Acta Hort. (ISHS)*, 528: 511-516.
- Lam, E., N. Kato und M. Lawton. 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411(6839): 848-853.
- Lamb, C. und R. A. Dixon. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48(1): 251-275.

- Lander, E. S. und D. Botstein. 1989. Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using Rflp Linkage Maps. *Genetics*, 121(1): 185-199.
- Lemke, L., M. Rex, E. Zyprian und R. Töpfer. 2011. A simple, inexpensive and environmentally friendly method for high throughput DNA extraction from grapevine (*Vitis* spp.). *Vitis*, 50(1): 7-10.
- Lipps, H. P. und M. Harms. 2004. Schwarzfäule - ein neues Problem im deutschen Weinbau. *Die Winzer-Zeitschrift*, 19(6): 28-29.
- Lott, H., F. Pfaff und B. Prior. 2010. *Taschenbuch der Rebsorten*, 14 edn. Fraund, Mainz, Germany.
- Luo, S., P. He, P. Zhou und X. Zheng. 2001. Identification of molecular genetic markers tightly linked to downy mildew resistant genes in grape. *Acta Genet Sinica*, 28(1): 76-82.
- Marguerit, E., C. Boury, A. Manicki, M. Donnart, G. Butterlin, A. Nemorin, S. Wiedemann-Merdinoglu, D. Merdinoglu, N. Ollat und S. s. d. i. f. Decroocq. 2009. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theor Appl Genet*, 118(7): 1261-1278.
- Martins, W. S., D. C. S. Lucas, K. F. Neves und D. J. Bertioli. 2009. WebSat - A web software for microsatellite marker development. *Bioinformation*, 3(6): 282-283.
- Maurel, C. 2007. Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Letters*, 581(12): 2227-2236.
- McDonald, B. A. und C. Linde. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 40(1): 349-379.
- Mejia, N., B. Soto, M. Guerrero, X. Casanueva, C. Houel, M. de los Angeles Miccono, R. Ramos, L. Le Cunff, J. M. Boursiquot, P. Hinrichsen und A. F. Adam-Blondon. 2011. Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenopermocarpic seedlessness in grapevine. *BMC Plant Biology*, 11(1): 57.
- Merdinoglu, D., G. Butterlin, L. Bevilacqua, V. Chiquet, A. F. Adam-Blondon und S. Decroocq. 2005. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Mol Breeding*, 15(4): 349-366.
- Mohr, H. D. 2005. *Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge an der Weinrebe*. Ulmer, Stuttgart, Germany.
- Moreira, F., A. Madini, R. Marino, L. Zulini, M. Stefanini, R. Velasco, P. Kozma und M. Grando. 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(1): 153-167.
- Müller, K. und H. Sleumer. 1934. Biologische Untersuchungen über die Peronosporakrankheit des Weinstockes. *Landwirtsch Jb*, 79(4): 509-576.
- Mysore, K. S. und C. M. Ryu. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci*, 9(2): 97-104.

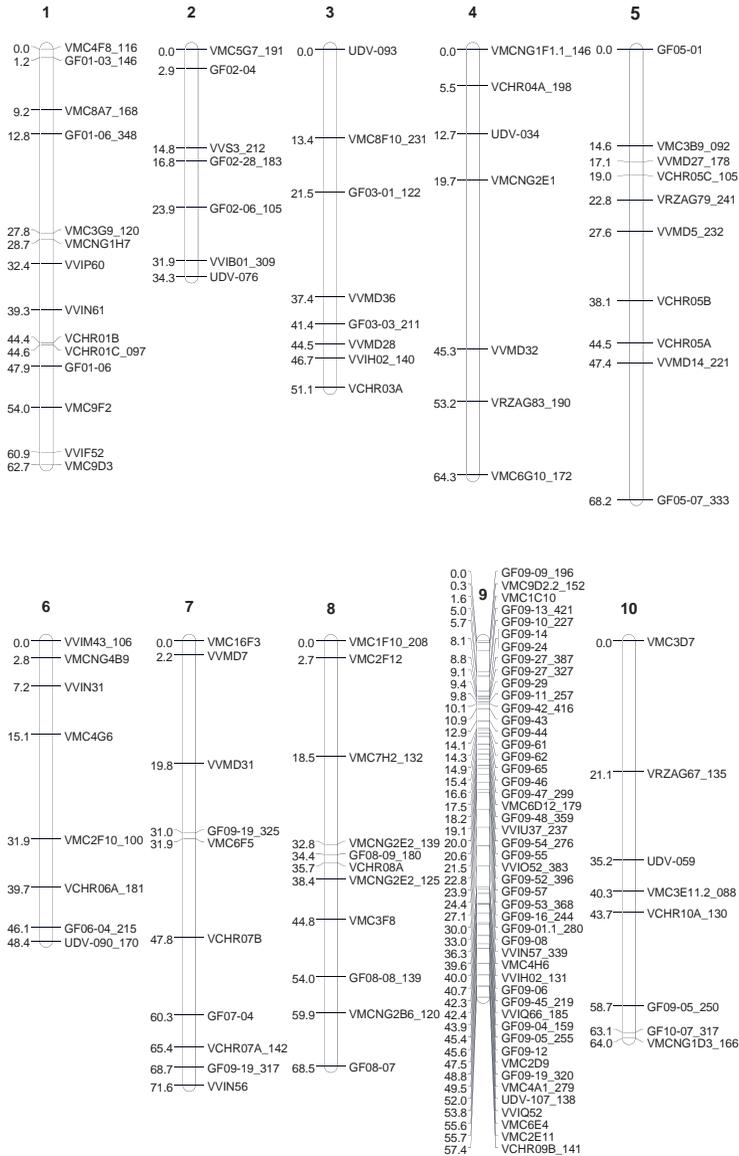
- Nicholas, P., P. Magarey and M. Wachtel. 1994. *Diseases and Pests: Grape Production Series No.1*. Winetitles, Adelaide, Australia.
- Nürnbergger, T. und V. Lipka. 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol*, 6(3): 335-345.
- Ordish, G. 1987. *The great wine blight*, 2 edn. Sidgwick & Jackson, London.
- Osbourn, A. E. 1996. Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell*, 8(10): 1821-1831.
- Park, C. J., K. J. Kim, R. Shin, J. M. Park, Y. C. Shin und K. H. Paek. 2004. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J*, 37(2): 186-198.
- Peressotti, E., S. Wiedemann-Merdinoglu, F. Delmotte, D. Bellin, G. Di Gaspero, R. Testolin, D. Merdinoglu und P. Mestre. 2010. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biol*, 10(147): 1-11.
- Pezet, R., K. Gindro, O. Viret und H. Richter. 2004a. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis*, 43(3): 145-148.
- Pezet, R., K. Gindro, O. Viret und J. L. Spring. 2004b. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiol Mol Plant P*, 65(6): 297-303.
- Pezet, R., C. Perret, J. B. Jean-Denis, R. Tabacchi, K. Gindro und O. Viret. 2003. delta-viniferin, a resveratrol dehydrodimer: One of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18): 5488-5492.
- Poupard, P., L. Parisi, C. Champion, S. Ziadi und P. Simoneau. 2003. A wound- and ethephon-inducible PR-10 gene subclass from apple is differentially expressed during infection with a compatible and an incompatible race of *Venturia inaequalis*. *Physiol Mol Plant P*, 62(1): 3-12.
- R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2011. Vienna, Austria.
- Rushton, P. J., J. T. Torres, M. Parniske, P. Wernert, K. Hahlbrock und I. E. Somssich. 1996. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO Journal*, 15(20): 5690-5700.
- Salmaso, M., G. Malacarne, M. Troggio, G. Faes, M. Stefanini, M. S. Grando und R. Velasco. 2008. A grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic map integrating the position of 139 expressed genes. *Theor Appl Genet*, 116(8): 1129-1143.
- Scherer, E. und U. Gisi. 2006. Characterization of Genotype and Mating Type in European Isolates of *Plasmopara viticola*. *J Phytopathol*, 154(7-8): 489-495.
- Schröder, Stephan. Plant immunity as a result of co-evolution: Using the pair grapevine / downy mildew as a model. 2010. Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Dissertation.

- Schröder, S., S. Telle, P. Nick und M. Thines. 2011. Cryptic diversity of *Plasmopara viticola* (Oomycota, Peronosporaceae) in North America. *Org Divers Evol*, 11(1): 3-7.
- Schwander, F., R. Eibach, I. Fechter, L. Hausmann, E. Zyprian und R. Töpfer. 2011. *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theor Appl Genet*, doi: 10.1007/s00122-011-1695-4: 1-14.
- Scott, K. D., P. Eggler, G. Seaton, M. Rossetto, E. M. Ablett, L. S. Lee und R. J. Henry. 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theor Appl Genet*, 100(5): 723-726.
- Sefc, K. M., I. Pejic, E. Maletic, M. R. Thomas and F. Lefort. 2009. Microsatellite Markers for Grapevine: Tools for Cultivar Identification & Pedigree Reconstruction in Roubelakis-Angelakis, K. A. (ed) *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Springer Netherlands.
- Shtin, L. T. und I. M. Filippenko. 1974. Inheritance of resistance to downy and powdery mildew in European-Amur grape hybrids. *Soviet Genetics*, 10: 1348-1363.
- Sotolar, R. 2007. Comparison of grape seedlings population against downy mildew by using different provocation methods. *Not Bot Horti Agrobo*, 35(2): 61-68.
- Staatliches Weinbauinstitut Freiburg. Sorteninfoblatt Merzling. <http://www.wbi-freiburg.de> . 16-2-2006. 14-6-2011.
- Staatliches Weinbauinstitut Freiburg. Sorteninfoblatt Solaris. <http://www.wbi-freiburg.de> . 6-2-2007. 14-6-2011.
- Staatliches Weinbauinstitut Freiburg. 2011. Rebschutz 2011. *Der Badische Winzer*, Sonderbeilage: 1-12.
- Stam, P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map. *The Plant Journal*, 3(5): 739-744.
- Thomas, M. R. und N. S. Scott. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (Stss). *Theor Appl Genet*, 86(8): 985-990.
- Thordal-Christensen, H. 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr Opin Plant Biol*, 6(4): 351-357.
- Töpfer, R., L. Hausmann and R. Eibach. 2011a. Molecular Breeding in Adam-Blondon, A. F., J. M. Martinez-Zapater and C. Kole (eds) *Genetics, Genomics and Breeding of Grapes*. Science Publishers, Enfield, USA.
- Töpfer, R., L. Hausmann, M. Harst, E. Maul, E. M. Zyprian and R. Eibach. 2011b. New Horizons for Grapevine Breeding in Flachowsky, H. and M. V. Hanke (eds) *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology 5*. Global Science Books.
- Trapletti, A. und Hornik, K. tseries: Time Series Analysis and Computational Finance. [R package version 0.10-26]. 2011.

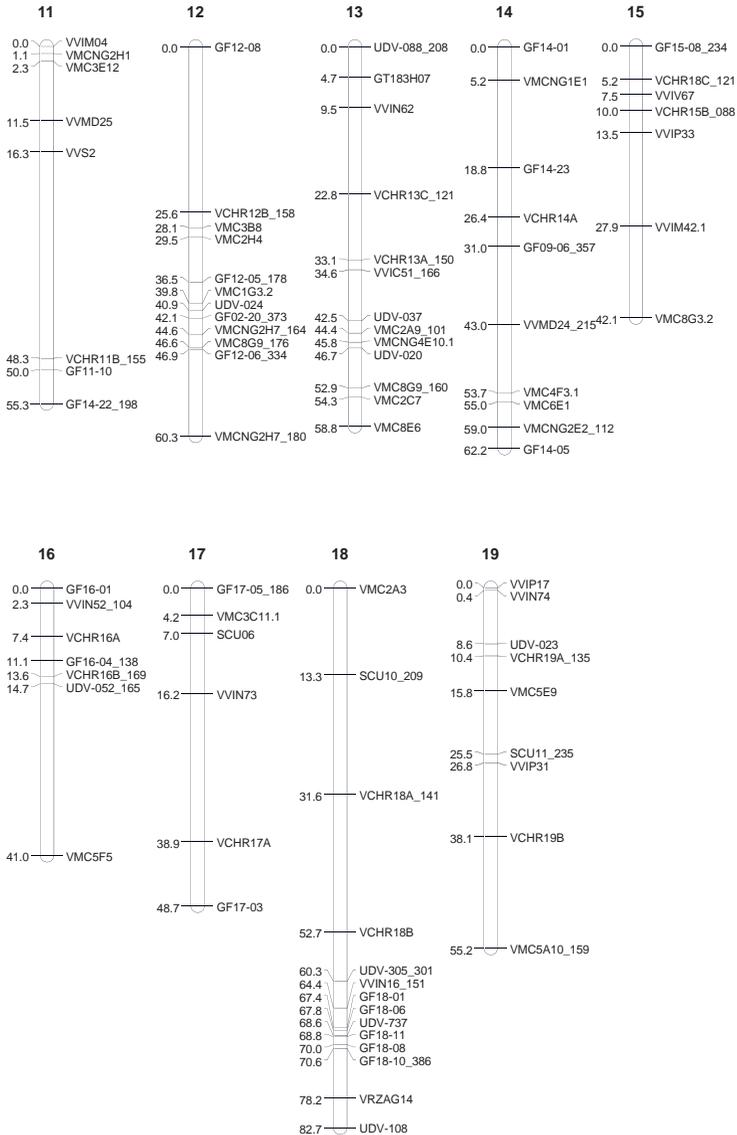
- Van Loon, L. C. und E. A. an Strien. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2): 85-97.
- van Loon, L. C., B. P. J. Geraats und H. J. M. Linthorst. 2006a. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 11(4): 184-191.
- van Loon, L. C., M. Rep und C. M. J. Pieterse. 2006b. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44(1): 135-162.
- Van Ooijen, J. W. 1992. Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theor Appl Genet*, 84(7): 803-811.
- Van Ooijen, J. W. Comparison of a single-QTL model with an approximate multiple-QTL model for QTL mapping. Van Ooijen, J. W. und Jansen, J. Proceedings of the 9th Meeting of EUCARPIA Section on Biometrics in Plant Breeding (1994). Biometrics in Plant Breeding: Applications of Molecular Markers , 205-212. 1994. Wageningen, Netherlands, Centre for Plant Breeding and Reproduction Research.
- Van Ooijen, J. W. JoinMap ® 4, Software for calculation of genetic linkage maps in experimental populations. 2006. Wageningen, Netherlands, Kyazma B.V.
- Van Ooijen, J. W. MapQTL ® 6, Software for mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. 2009. Wageningen, Netherlands, Kyazma B.V.
- Velasco, R., A. Zharkikh, M. Troggio, D. A. Cartwright, A. Cestaro, D. Pruss, M. Pindo, L. M. FitzGerald, S. Vezzulli, J. Reid, G. Malacarne, D. Iliev, G. Coppola, B. Wardell, D. Micheletti, T. Macalma, M. Facci, J. T. Mitchell, M. Perazzolli, G. Eldredge, P. Gatto, R. Oyzerski, M. Moretto, N. Gutin, M. Stefanini, Y. Chen, C. Segala, C. Davenport, L. Dematte, A. Mraz, J. Battilana, K. Stormo, F. Costa, Q. Z. Tao, A. Si-Ammour, T. Harkins, A. Lackey, C. Perbost, B. Taillon, A. Stella, V. Solovyev, J. A. Fawcett, L. Sterck, K. Vandepoele, S. M. Grando, S. Toppo, C. Moser, J. Lanchbury, R. Bogden, M. Skolnick, V. Sgaramella, S. K. Bhatnagar, P. Fontana, A. Gutin, Y. Van de Peer, F. Salamini und R. Viola. 2007. A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. *Plos One*, 2(12): e1326.
- Vezzulli, S., M. Troggio, G. Coppola, A. Jermakow, D. Cartwright, A. Zharkikh, M. Stefanini, M. Grando, R. Viola, A. F. Adam-Blondon, M. Thomas, P. This und R. Velasco. 2008. A reference integrated map for cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) from three crosses, based on 283 SSR and 501 SNP-based markers. *Theor Appl Genet*, 117(4): 499-511.
- Voorrips, R. E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered*, 93(1): 77-78.
- Wan, Y., H. Schwaninger, P. He und Y. Wang. 2007. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. *Vitis*, 46: 132-136.
- Wang, H., M. Q. Qi und A. J. Cutler. 1993. A Simple Method of Preparing Plant-Samples for PCR. *Nucleic Acids Res*, 21(17): 4153-4154.
- Wang, X. P. und Wang, Y. J. Isolation and diversity analysis of resistance gene analogs (RGAs) from wild Chinese *Vitis* species. Submitted May 2006 to the EMBL GenBank DDBJ databases . 2006.

- Welter, L. J., N. Gokturk-Baydar, M. Akkurt, E. Maul, R. Eibach, R. Töpfer und 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(4): 359-374.
- Wirdnam, C., A. Motoyama, E. Arn-Boulidoires, S. van Eeden, A. Iglesias und F. Meins. 2004. Altered expression of an ankyrin-repeat protein results in leaf abnormalities, necrotic lesions, and the elaboration of a systemic signal. *Plant Mol Biol*, 56(5): 717-730.
- Wojtaszek, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J*, 322(3): 681-692.
- Wong, F. P., H. N. Burr und W. F. Wilcox. 2001. Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathol*, 50(4): 427-432.
- Wu, J. A., Y. L. Zhang, H. Q. Zhang, H. Huang, K. M. Folta und J. A. Lu. 2010. Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurensis* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology. *BMC Plant Biol*, 10.
- Wu, T., Z. Tian, J. Liu, C. Yao und C. Xie. 2009. A Novel Ankyrin Repeat-rich Gene in Potato, *Star*, Involved in Response to Late Blight. *Biochem Genet*, 47(5): 439-450.
- Xu, Z. S., M. Chen, L. C. Li und Y. Z. Ma. 2011. Functions and Application of the AP2/ERF Transcription Factor Family in Crop ImprovementF. *J Integr Plant Biol*, 53(7): 570-585.
- Zhang, J. K., L. Hausmann, R. Eibach, L. J. Welter, R. Töpfer und E. M. Zyprian. 2009. A framework map from grapevine V3125 (*Vitis vinifera* 'Schiava grossa' x 'Riesling') x rootstock cultivar 'Börner' (*Vitis riparia* x *Vitis cinerea*) to localize genetic determinants of phylloxera root resistance. *Theor Appl Genet*, 119(6): 1039-1051.

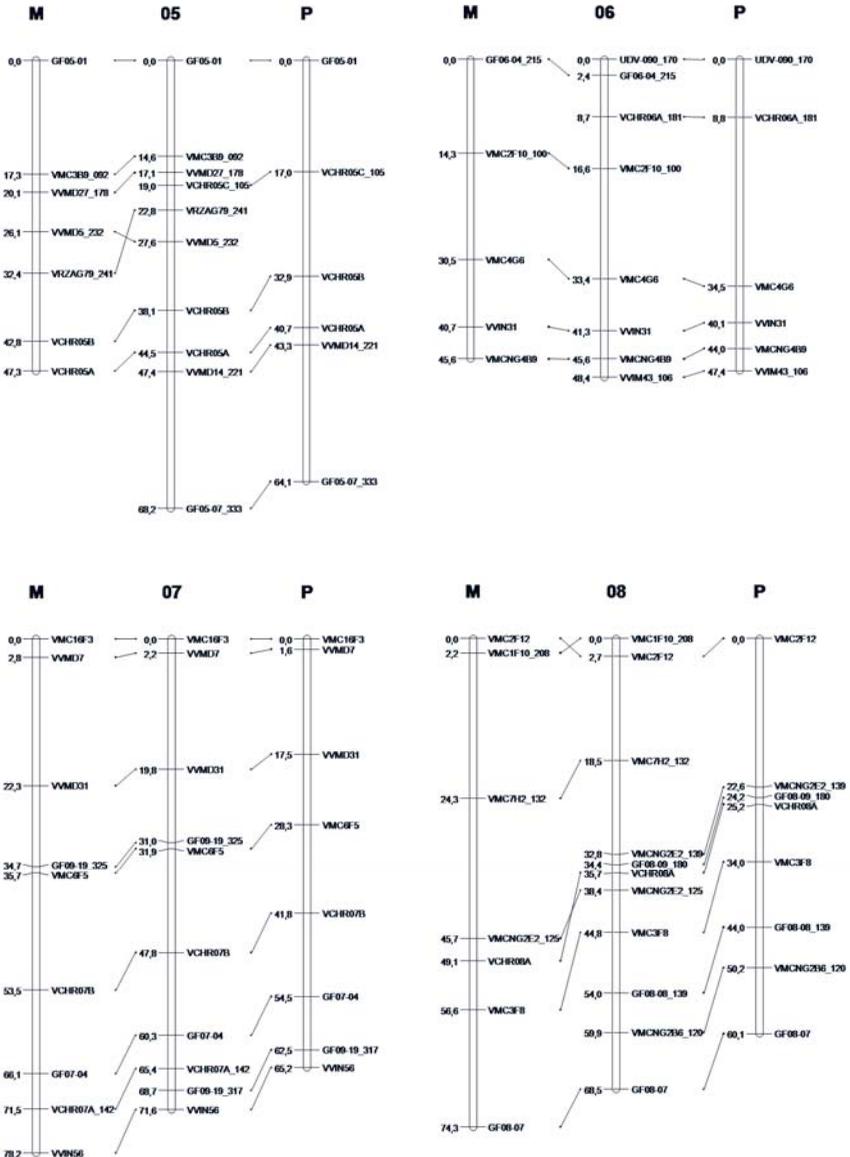
Anhang



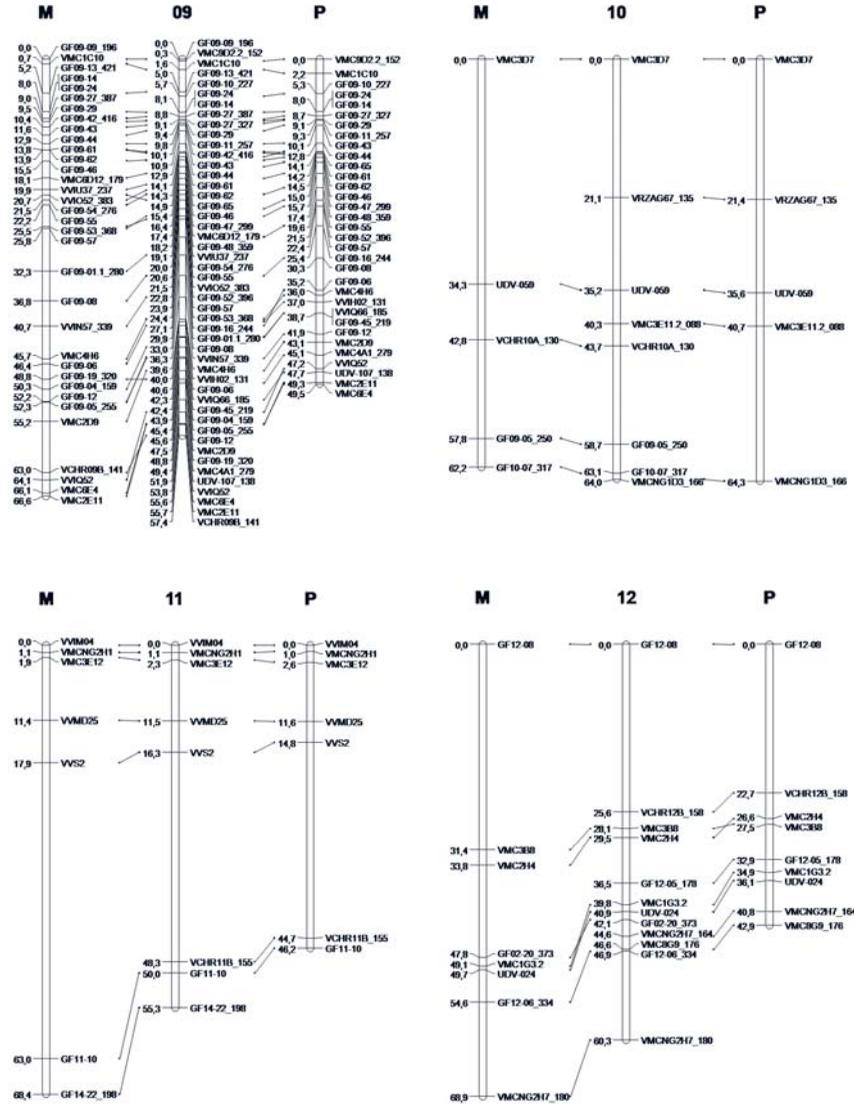
Anhang 1a: LG 01 bis LG 10 der integrierten genetischen Karte (Details siehe nächste Seite).



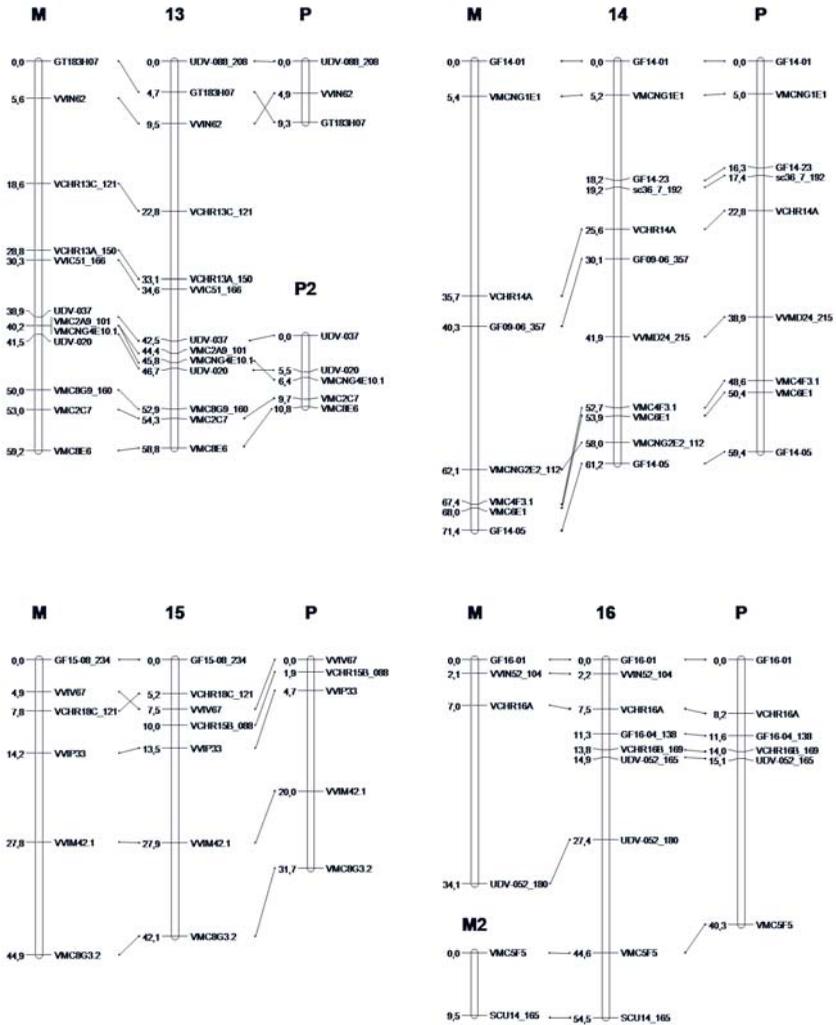
Anhang 1b: LG 11 bis LG 19 der integrierten genetischen Karte der Kreuzungspopulation *Gf.Ga-52-42 x 'Solaris'* mit 219 SSR-Markern. Der Umfang der Population beträgt 265 Individuen. Markerabstände in centi Morgan (cM). An die Markernamen angehängt sind die codierten Fragmentlängen (bp) bei Markern, welche nur in einem Elternteil heterozygot sind.



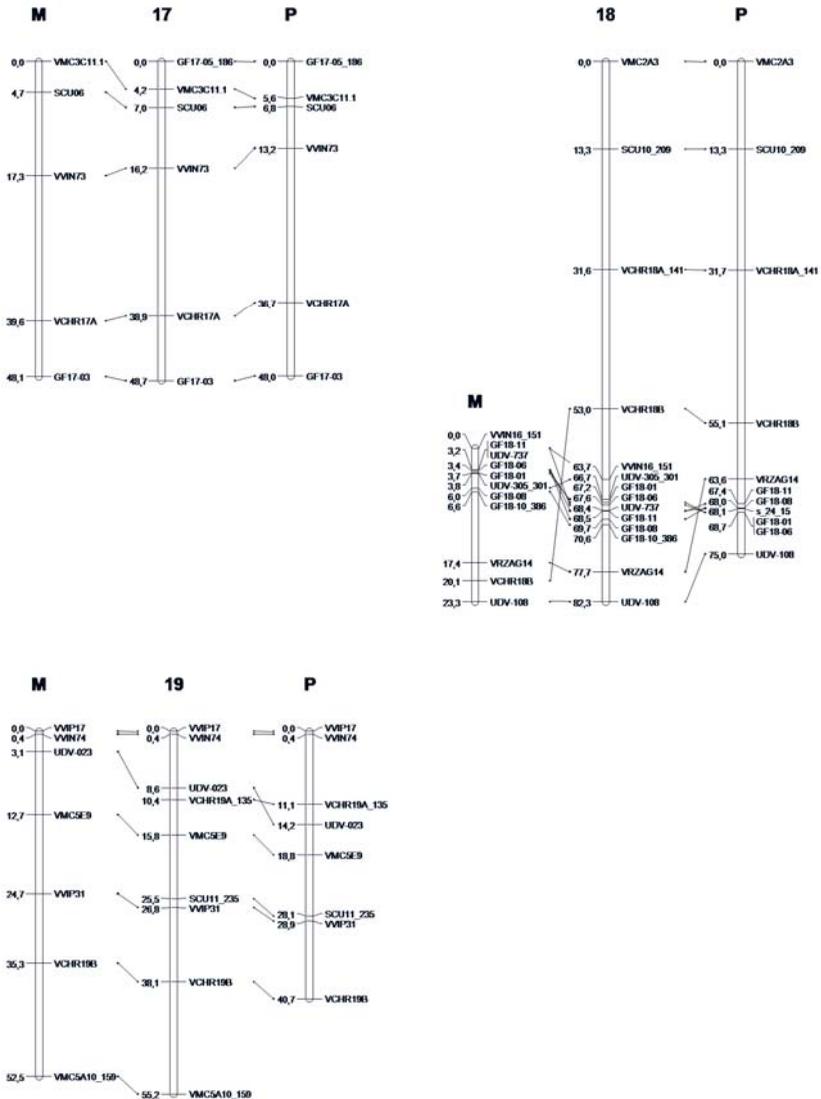
Anhang 2b: Kopplungsgruppen 05 bis 08 mit der maternalen Gf.Ga-52-42 Karte (M) links, der integrierten Karte (LG-Nr.) in der Mitte und der paternalen ‘Solaris’ Karte (P) rechts. Die Positionen der Marker auf den Karten sind über Linien miteinander verbunden.



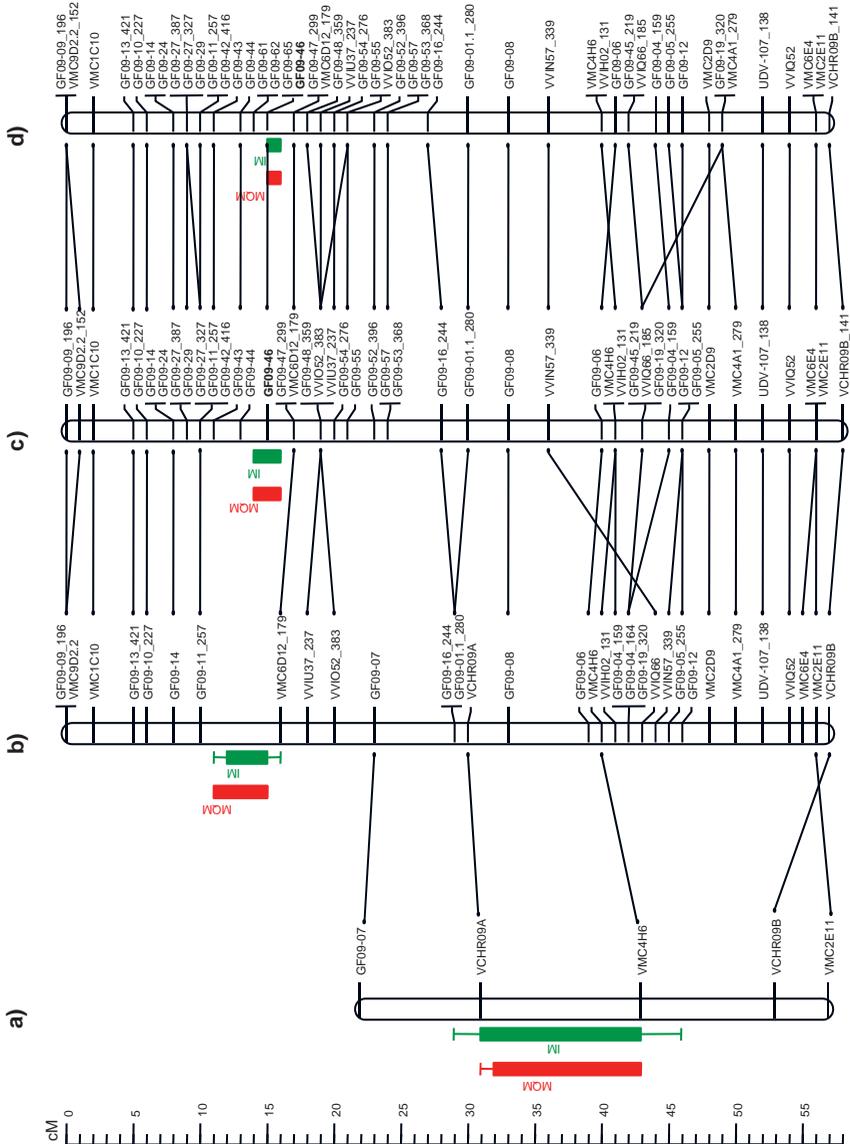
Anhang 2c: Kopplungsgruppen 09 bis 12 mit der maternalen Gf.Ga-52-42 Karte (M) links, der integrierten Karte (LG-Nr.) in der Mitte und der paternalen ‘Solaris’ Karte (P) rechts. Die Positionen der Marker auf den Karten sind über Linien miteinander verbunden.



Anhang 2d: Kopplungsgruppen 13 bis 16 mit der maternalen Gf.Ga-52-42 Karte (M) links, der integrierten Karte (LG-Nr.) in der Mitte und der paternalen 'Solaris' Karte (P) rechts. Die Positionen der Marker auf den Karten sind über Linien miteinander verbunden.



Anhang 2e: Kopplungsgruppen 17 bis 19 mit der maternalen Gf.Ga-52-42 Karte (M) links, der integrierten Karte (LG-Nr.) in der Mitte und der paternalen 'Solaris' Karte (P) rechts. Die Positionen der Marker auf den Karten sind über Linien miteinander verbunden.



Anhang 3: Kartierungsablauf des *Rpv10*-Locus von der Identifikation auf der LG 09 (a) über mehrere Zwischenstufen (b, c) bis zur Feinkartierung (d). Dargestellt sind die jeweiligen Versionen der Kopplungsgruppe, die 1-LOD- und 2-LOD-Konfidenzintervalle für IM (grün) und MQM (rot). Die Versionen sind über die homologen Marker verknüpft um die Entwicklung der LG nachvollziehen zu können.

Anhang 4: Ermittelte Fragmentlängen der für die Kartierungsarbeiten und die Stammbaumanalysen verwendeten SSR-Marker der Kreuzungseltern 'Solaris' und Gf.Ga-52-42, sowie den getesteten Sorten mit Relevanz für die Stammbaumanalysen.

Marker	LG	Kreuzungs- muster	Gf.Ga-52-42	Solaris	Bacchus Weiss	Villard Blanc	Merzling	Stervermyl	Muskat Ottelon	Riesling Weiss	Seyval	Zarya Severa
GF01-03	01	<nxnp>	141	146	141	143	na	141	141	141	146	na
GF01-06	01	<efbeg> & <nxnp>	0	339	333	0	339	na	333	339	333	348
GF02-04	02	<efbeg>	301	315	315	301	305	315	306	311	301	305
GF02-06	02	<nxnp>	99	105	99	114	99	105	105	99	123	99
GF02-20	02	<lmxl>	373							373		na
GF02-28	02	<nxnp>	192	183	192	192	192	192	183	192	192	192
GF03-01	03	<lmxl>	118	122	118	122	na	118	118	118	118	na
GF03-03	03	<lmxl>	211	219	0	219	211	219	211	219	219	na
GF05-01	05	<efbeg>	172	175	175	172	165	175	172	175	165	162
GF05-07	05	2x <nxnp>	331	0	333	340	340		333	340	331	343
GF06-04	06	2x <lmxl>	202	215	207	202	215	207	202	207	202	207
GF07-04	07	<abxcd>	234	243	234	243	na	264	234	260	234	246
GF08-07		<efbeg>	216	243	230	243	212 / 243	212	224	224	243	230
GF08-08	08	<nxnp>	173	173	139	173	139	166	166	173	139	144
GF08-09	08	<nxnp>	0	182	180	182	180	182	182	181	180	182
GF09-01.1	09	<lmxl>	280	259	266	280	259		259	280	259	272
GF09-04	09	2x <lmxl>	159	164	0	159	164	159	164	164	159	159
GF09-05	09	2x <lmxl>	250	253 / 255	253	255	250	250	255	250	255	250
GF09-06	09	<lmxl>	357		357	na	na				357	na
GF09-06	09	<efbeg>	141	0	159	0	na	159				na
GF09-08	09	<efbeg>	247	259	247	259	247	259	247	259	247	259
GF09-09	09	2 x <lmxl>	191	196	191	196	191	196	191	194	191	194
GF09-10	09	2 x <nxnp>	215	215	215	233	215	218	215	218	218	230
GF09-11	09	<nxnp>	281	281	285	276	281	257	254	281	276	260
GF09-12	09	<efbeg>	271	287	271	287	338	271	287	343	287	338
GF09-13	09		419	421	419	419	419	417	419	419	419	419
GF09-14	09	<abxcd>	357	353	353	357	369	351	353	357	369	373
GF09-16	09	<nxnp>	244	244			244	244				244

Marker	LG	Kreuzungs- muster	GF/Ga-52-42	Solaris	Bacchus Weiss	Villard Blanc	Merzling	Serravalle	Muskat Ottoneil	Riesling Weiss	Seyval	Zarya Severa
GF09-19	09	<lmxl>	320	<320>	320	320	320	320	320	320		
GF09-19	09	<lmxl>	325		325	325	325			325		325
GF09-19_317	09	<lnxmp>	317	317			317	317				
GF09-24	09	<abxcd>	371	352	367	378	367	371	378	371	367	371
GF09-27	09	<lmxl> & <lnxmp>	384	387	374	387	327	376/ 384	384	384	327	377/ 384
GF09-29	09	<efbeg>	313	341	317	341	307	313	335	341	320	334
GF09-42	09	<lmxl>	416		416	416			322	334	336	341
GF09-43	09	<efbeg>	422	426	422	426	428	422	424	422	422	424
GF09-44	09	<efbeg>	242	245	244	245	242	245	230	244	236	245
GF09-45	09	<lnxmp>	213	219	213	213	213	213	213	213	213	213
GF09-46	09	<efbeg>	424	426	424	426	408	424	406	426	417	424
GF09-47	09	<lnxmp>	296	296	296	289	296	289	296	296	296	289
GF09-48	09	<lnxmp>	349	349	349	349	349	359	349	349	349	352
GF09-52	09	<lnxmp>	393	393	396	393	393	396	393	393	393	na
GF09-53	09	<lmxl>	364	368	0	364	368	385	356	368	368	368
GF09-54	09	<lmxl>	276	270	0	270	276	270	270	276	270	276
GF09-55	09	<efbeg>	238	264	245	238	264	250	238	264	238	264
GF09-57	09	<efbeg>	347	366	347	366	347	366	347	366	347	366
GF09-61	09	<efbeg>	418	0	418	418	418	408	418	418	418	na
GF09-62	09	<efbeg>	409	393		409		393	394	412	409	
GF09-65	09	<lnxmp>	316	312	316	322	316	312	316	316	316	
GF10-07	10	<lmxl>	316	317	316	314	317	314	310	316	314	316
GF11-10	11	<efbeg>	142	159	142	159	142	159	133	151	142	159
GF12-05	12	<lnxmp>	167	167	178	167	169	178	169	169	167	178
GF12-06	12	<lmxl>	334		334							
GF14-01	14	<abxcd>	178	164	170	170	170	164		164	164	170
GF14-05	14	<abxcd>	215	222	216	215	216	212	215	215	215	216
GF14-22_198	14	<abxcd>	82	75	0	82	75	0	85	88	94	85
GF14-23	14	<lnxmp>	198		198	198					198	
GF15-08	15	<lmxl>	398	398	398	398	394	398	398	398	402	398
GF16-01	16	<efbeg>	225	234	225	234	na	225	234	225	234	na
GF16-04	16	<lnxmp>	350	342	337	342	339	350	342	353	346	350
GF17-03	17	<abxcd>	138	138		138						138
GF17-05	17	<lnxmp>	304	280	291	304	280	291	302	291	304	280
			186		186	186	na	186	186	186	186	na

Marker	LG	Kreuzungs- muster	GL:Ca-52:42	Solaris	Bacchus Weiss	Villard Blanc	Merzling	Servennoj	Muskat Ottoneel	Riesling Weiss	Sevval	Zarya Severa
GF18-01	18	<abxcd>	279; 274	277; 267	279; 274	274; 277	274; 277	266; 267	277; 277	279; 279	277; 277	271; 271
GF18-06	18	<abxcd>	382; 388	375; 387	382; 388	388; 388	375; 376	382; 397	370; 387	382; 385	375; 375	371; 382
GF18-08	18	<abxcd>	391; 397	386; 387	391; 381	397; 386	386; 387	387; 388	386; 387	386; 391	387; 387	na
GF18-10	18	<lmxl>	386		386	386	386	386		386		
GF18-11	18	<abxcd>	493; 485	0; 487	493	485	493	493	487	493	493	
GT183H07	13	<efbeg>	246; 252	252; 252	246; 252	246; 255	252; 255	246; 252	252; 252	255; 255	255; 255	246; 255
SCU06	17	<abxcd>	164; 0	163; 175	164	178; 187	na	171; 175	177; 177	165; 175	172; 187	na
SCU10	19	<nxmp>	209; 209	206; 209	209; 209	na	na	206; 209	215; 206	206; 209	209; 209	na
SCU11	19	<nxmp>	248; 248	235; 242	248	na	na	235; 248	248; 248	248; 248	242; 242	na
SCU14	16	<lmxl>	165; 179	179; 179	165; 179	165; 179	165; 179	177; 179	165; 179	165; 179	179; 183	176; 179
UDY-020	151	<abxcd>	151; 0	144; 146	140; 151	146; 0	na	144; 137	146; 146	146; 146	146; 146	144; 144
UDY-023	19	<abxcd>	190; 179	226; 201	190; 201	179; 184	na	184; 201	179; 201	190; 201	201; 201	226; 226
UDY-024	12	<efbeg>	197	177	177; 197	186; 177	177	177; 186	177; 177	177; 197	177; 197	
UDY-034	04	<abxcd>	181; 169	171; 178	178; 181	169; 181	na	167; 180	167; 178	169; 181	171; 180	na
UDY-037	13	<abxcd>	158; 160	167; 169	158; 167	160	158; 167	158; 169	158; 169	158; 167	158; 167	na
UDY-052	16	<lmxl> & <nxmp>	0; 180		165; 165	180; 184	0; 165	165; 172	165; 165	170; 180	167; 170?	165; 167
UDY-059	10	<efbeg>	146; 162	141; 162	141; 162	146; 146	na	na	162; 162	141; 162	146; 146	na
UDY-076	02	<efbeg>	181; 166	158; 166	170; 181	na	na	158; 179	153; 158	158; 166	168; 178	na
UDY-088	13	<nxmp>	208		208	208	208				208; 208	
UDY-090	06	<nxmp>	144; 144	144; 170	144	144	144	147; 170	144; 170	141; 144	144; 144	146; 170
UDY-093	03	<efbeg>	163; 167	150; 167	163	157; 167	150; 167	154; 158	150; 158	154; 164	150; 150	150
UDY-107	09	<nxmp>	138		138	138	138					138
UDY-108	18	<abxcd>	214; 237	227; 238	214; 234	237	227; 238	214; 250	214; 238	214; 238	227; 240	na
UDY-122	18	<lmxl>	223	223	223	na	na	223; 223	223; 223	223; 223		na
UDY-305	18	<lmxl>	301		301	301	301			230		na
UDY-737	18	<abxcd>	298; 281	274; 309	293; 298	281; 302	274; 287	287; 304	291; 309	298; 274	299; 299	
VCHR01B	01	<efbeg>	95; 108	95; 87	95; 108	87; 108	na	95; 108	95; 108	95; 108	87; 87	na
VCHR01C	01	<lmxl>	89; 97	89; 0	89; 97	89; 97	na	89; 89	89; 89	97; 97	89; 97	na
VCHR03A	03	<efbeg>	181; 200	187; 200	200; 209	na	na	na	187; 200	na	na	na
VCHR04A	04	<nxmp>	181	198; 181	na	na	na	na	na	na	na	na
VCHR05A	05	<efbeg>	242; 239	258; 239	239	242; 258	na	198; 258	239; 251	242; 258	242; 258	na
VCHR05B	05	<efbeg>	177; 194	182; 194	182; 194	177; 190	na	190; 194	194; 194	194; 194	177; 190	na
VCHR05C	05	<nxmp>	102	102; 105	102	105; 102	na	105; 125	102; 102	102; 102	105; 105	na
VCHR06A	06	<nxmp>	0; 0	176; 181	185; 181	181	na	172; 181	181; 181	170; 170	176; 181	na

Marker	LG	Kreuzungs- muster	GL-Ga-52-42	Solaris	Bacchus Weiss	Villard Blanc	Merzling	Servenmyj	Muskat Ottoneil	Riesling Weiss	Seyval	Zarya Severa
VCHR07A	07	<lmxl> & <nrxmp>	142; 137	127; 137	142	137	na	137	137; 142	142	137	na
VCHR07B	07	<abxcd>	177; 186	169; 190	186	177	na	181; 190	169; 177	186	169; 177	na
VCHR08A	08	<efbeg>	208; 0	198; 0	191; 208	na	na	198	198	191	198	na
VCHR09B	09	<lmxll>	0	141; 0	141	na	na	na	na	141	na	na
VCHR10A	10	<lmxll>	130	na	130	130	na	na	na	na	na	na
VCHR11B	11	<nrxmp>	159; 159	151; 155	155; 159	159	na	155	155	155; 159	155; 163	na
VCHR12B	12	<nrxmp>	166; 166	158; 166	166; 166	166	na	158; 166	166	166	166	na
VCHR13A	13	<lmxll>	150; 139	139; 139	145; 150	139	na	139; 150	139; 150	145; 150	134; na	na
VCHR13C	13	<lmxll>	114; 121	124; 124	124; 121	121	107; 114	114	114; 124	114	114; 121	na
VCHR14A	14	<efbeg>	187; 130	192; 130	187; 176	130	na	187; 192	130; 187	175; 130	130	na
VCHR15B	15	<nrxmp>	0	80; 88	80	80	na	80; 90	88	88	93; 73	80
VCHR16A	16	<efbeg>	119; 111	100; 111	100; 111	119	na	100; 107	100	111; 119	119	na
VCHR16B	16	<nrxmp>	189; 169	169; 189	189	189	169; 189	189	189	165; 189	169; 189	na
VCHR17A	17	<efbeg>	156; 183	174; 183	183	156; 183	na	156	174; 183	183	162; 183	na
VCHR18A	18	<nrxmp>	158; 158	141; 150	158; 162	150	141; 150	162; 169	162	150	162	na
VCHR18B	18	<efbeg>	144; 149	144; 145	144; 153	135; 149	144	145; 153	145; 144	145	144; 149	na
VCHR18C	18	<lmxll>	121; 127	127	121; 127	121; 127	na	121; 127	121; 127	127	127	na
VCHR19A	19	<nrxmp>	132; 132	135; 149	na	na	na	na	na	na	na	na
VCHR19B	19	<abxcd>	167; 171	163; 0	167; 171	171	171	171	163; 167	167	na	na
VMC16F3	07	<abxcd>	177; 0	165; 185	177; 185	177; 0	na	165; 186	179; 185	177; 182	185	na
VMC1C10	08	<abxcd>	168; 133	149; 146	156; 168	133; 162	149; 168	146; 162	143; 156	143; 168	149; 161	na
VMC1F10	08	<lmxll>	208; 204	0	204; 208	204	na	208	202	208	204	na
VMC1G3.2	12	<efbeg>	138	0	130; 0	124	138	0	124	138	na	123
VMC2A3	18	<efbeg>	159; 157	155; 157	157; 175	151; 159	157; 159	155; 181	149; 181	157; 175	159; 171	146; 134
VMC2A9	09	<lmxll>	101; 95	95	95	101	95	95	95	95	95	95
VMC2C7		<abxcd>	139	132; 141 / 143	141; 143	139	na	132; 141 / 145	139; 141	146	132; 139 / 143	na
VMC2D9	09	<efbeg>	63; 68	88; 68	63; 68	68	66; 88	68	88	63	66	88; 63
VMC2E11	09	<abxcd>	97; 106	108; 91	97	106	na	91	108	97	101; 108	na
VMC2F10	06	<lmxll>	98; 100	94; 94	94	98; 100	na	100; 104	94	100	94	100
VMC2F12	08	<efbeg>	252; 213	190; 213	252	194; 213	213	252	190; 252	194; 210	193; 252	202; 213
VMC2H4	12	<abxcd>	0	202; 229	208; 225	202; 208	na	208; 220	202; 215	208	208; 229	na
VMC3B8	12	<abxcd>	161; 147	165; 141	131; 161	141; 147	147; 165	132; 141	147; 161	133; 157	136; 165	na
VMC3B9	05	<lmxll>	92	na	92	92	92	92	92	92	92	92
VMC3C1.1	17	<abxcd>	114; 107	102; 120	114	107	96; 120	102; 111	99; 111	114; 120	96; 99	100; 120

Marker	LG	Kreuzungs- muster	GL-Ga-52-42	Solaris	Bacchus Weiss	Villard Blanc	Merzling	Servernvi	Muskat Ottoneil	Riesling Weiss	Seyval	Zarya Severa
VMC3D7	10	<efbeg>	156; 161	159; 161	156; 159	na	na	156; 159	159; 161	159; 161	161; 170	na
VMC3E1.2	10	<nnxmp>	80	80; 88	80; 83	na	na	80	88	80; 88	88	na
VMC3E12	136	0	117	123	136	0	na	117	136	123	136	na
VMC3F5	18	<lmxl>	109	114	109	na	109	114	109	109	109	117
VMC3F8	08	<efbeg>	260; 268	257; 268	260; 268	na	na	257	260	257; 268	266	na
VMC3G9	01	<lmxl>	120	123	123	120	130	123	120	123	123	131
VMC4A1	09	<nnxmp>		279			279		279		279	
VMC4F3.1	12	<efbeg>	160	0	164	0	na	164		164		na
VMC4F8	01	<lmxl>	115	116	115	116	115	115	115	115	115	115
VMC4G6	06	<efbeg>	139	121	129	139	121	na	125	123	127	na
VMC4H6	09	<efbeg>	156; 160	154	160	154	156	154	160	156; 160	156; 158	na
VMC5A10	19	<lmxl>	159		159			159	159	159		159
VMC5E9	192	213	194	207	192	204	192	213	194	207	192	194
VMC5F5	16	<efbeg>	64	0	64	na	na	64	64	95	64	95
VMC5G7	02	<lmxl>	191	198	198	198	na	191	198	198	198	na
VMC6D12	09	<lmxl>	171	179	171	178	179	na	178	171	169	178
VMC6E1	14	<efbeg>	129	0	149	0	129	142	140	142	141	149
VMC6E4	09	<abxcd>	0	141	145	112	141	145	112	143	145	112
VMC6F5	17	<abxcd>	321	342	317	334	321	334	317	321	317	na
VMC6G10	04	<lmxl>	139	172	164	164	172	164	139	164	172	139
VMC7H2	08	<lmxl>	132	120	120	132	120	129	132	132	120	na
VMC8A7	01		168		168	na	na					na
VMC8E6	04	<abxcd>	0	280	263	253	280	263	253		263	254
VMC8F10	03	<lmxl>	231	196	196	na	na	na	na	na	na	na
VMC8G3.2	15	<efbeg>	290	297	285	297	297	293	285	295	293	297
VMC8G9	12	3x <lmxl> & 2x <nnxmp>	160	170	176	182	160	170	182	160	170	165
				/173	/173	190	na	158	174	170	182	165
								/176	/173	/173		182
VMC9D2.2	09	<nnxmp>	148	148	152	0	148	148	152	148	148	148
VMC9D3	01	<abxcd>	206	189	187	200	193	206	200	193	187	189
VMC9F2	01	<abxcd>	209	288	283	311	208	288	209	290	311	285
				166				166				166
VMCNG1D3	14	<abxcd>	104	0	79	96	87	104	96	94	74	79
VMCNG1F1.1	04	<nnxmp>	134	146	134	143	134	146	144	134	136	143
VMCNG1H7	01	<abxcd>	209	182	174	201	196	209	174	182	201	195
VMCNG2B6	08	<nnxmp>	118	0	118	120	118	117	120	117	122	109

Marker	LG	Kreuzungs- muster	GLGa-52:42	Solaris	Bacchus Weiss	Villard Blanc	Merzling	Servenynj	Muskat Otonel	Riesling Weiss	Seyval	Zarya Severa
VMNG2E1	04	<efveg>	119; 111	101; 111	111	119	na	101	101; 111	101; 111	101; 105	na
VMNG2E2			112; 125	123; 139	112; 123	125; 131	na	138; 140	115; 139	121	125; 139	na
VMNG2H1	11	<efveg>	240; 263	243; 263	240; 243	263	na	255; 263		240; 243	240; 263	na
VMNG2H7a		<lmxl>	180; 0	184; 0	186; 0	180; 184	184		186		178; 184	180
VMNG2H7a		<nxnpx>		146				146				146
VMNG4B9	06	<efveg>	149; 157	136; 157	136; 157	149; 157	128; 136	149; 157	157; 161	136	136	149; 157
VMNG4E10.1	13	<abxcd>	291; 230	259; 265	259; 291	230	na	265	265; 291	259; 291	247; 259	na
VRZAG14	18	<efveg>	163	138	142	163	138	138	138			136
VRZAG67	15	<nxnpx>		135	135		na	135	135	135		na
VRZAG79	05	<lmxl>	241			241	na					na
VRZAG83	04	2x <lmxl>	188; 190		188; 190	190	na	190	190	188; 193	188; 194	na
VV1B01	02	<lmxl>	301; 309	301	301	292; 309	na	293; 307	297	291	301; 287	293; na
VV1C51	10	<lmxl>	166; 168	161; 161	159; 166	168	na	184	161; 166	156; 166	161; 172	na
VV1F52	01	<abxcd>	248; 258	250; 260	258; 260	248; 270	250	274; 281	258; 260	260	248; 250	260; 274
VV1H02	09	<nxnpx>	137	137; 140	137		137	131	140	137		125; 131
VV1M04	11	<abxcd>	88; 76	102; 82	88; 102	76	88; 102	82	76	88	102; 76	88; 82
VV1M42.1	15	<efveg>	277; 261	264; 261	261	277	na	261; 268	264	256; 273	256; 261	na
VV1M43	06	<nxnpx>	82	0	82; 106	82	86	106	90	95	82; 94	na
VV1N16	18	<lmxl>	146; 151	146	149; 151	146; 151	na	146; 151	146	151	151; 146	na
VV1N31	06	<abxcd>	140; 166	161; 168	140; 168	152; 166	na	161; 163	140	161	168; 156; 164	na
VV1N52	16	<lmxl>	88; 104	88; 88	88; 104	98; 104	na	88	88; 104	88; 104	104	na
VV1N56	07	<efveg>	166; 160	168; 160	160; 171	160; 166	162; 171	160	169	160; 171	166; 168	160; 171
VV1N57	09	<lmxl>	339			339				339		
VV1N61	01	<abxcd>	361; 373	356; 375	373	358; 361	na	347; 375	361; 375	373	354; 356	na
VV1N62	13	<abxcd>	357; 365	0	359; 363	365	na	351; 357	357; 359	357; 363	363	na
VV1N73	17	<abxcd>	259; 268	264; 266	259; 266	256; 268	na	264; 266	266	266	256	na
VV1N74	19	<efveg>	283; 279	286; 279	286; 279	281; 283	279; 281	279; 290	286; 289	279	282	286; 289
VV1O52	09	<lmxl>	383			383				383	383	383
VV1P17	19	<efveg>	80; 76	82; 76	76	78	80; 76	76	86	82; 86	76	82; 86
VV1P31	19	<abxcd>	173; 177	184; 170	173	173; 177	na	170; 177	182	173	170; 184	na
VV1P33	15	<efveg>	404; 346	396; 346	na	na	na	na	na	na	na	na
VV1P60	01	<abxcd>	306; 317	321; 0	306; 323	317; 321	na	317; 323	317; 321	306; 323	321	na
VV1Q52	09	<abxcd>	76; 78	83; 85	78	76; 78	78; 83	78; 85	83	76; 83	78; 83	78; 85

Marker	LG Kreuzungs- muster	GLGa-52-42	Solaris	Bacchus Weiss	Villard Blanc	Merzling	Servornyi	Muskat Ottoneil	Riesling Weiss	Seyval	Zarya Severa
VVI066	09 <nxmp>	183	183	183	183	183	183	183	180	183	183
VVII37	09 <lmxl>	237			237				237		237
VVIV67	15 <efbeg>	338	338	362	338	na	338	373	338	355	na
VVMD14	05 <nxmp>	229	221	229	229	na	221	227	235	235	na
VVMD24	14 <nxmp>	209	204	215	206	204	204	215	206	215	209
VVMD25	11 <efbeg>	248	236	254	240	254	236	254	248	254	236
VVMD27	05 <lmxl> & <nxmp>	178	174	186	178	186	178	180	178	186	na
VVMD28	03 <abxcd>	230	238	220	230	246	246	254	260	270	236
VVMD31	07 <abxcd>	203	213	203	213	na	209	222	215	203	213
VVMD32	04 <efbeg>	274	242	266	242	258	241	242	242	266	254
VVMD36	03 <efbeg>	266	251	261	237	266	261	261	273	251	261
VVMD5	16 <lmxl>	232				na			232		na
VVMD7	07 <abxcd>	246	236	242	236	237	240	246	237	242	247
VWS2	11 <abxcd>	152	143	136	132	143	128	134	132	143	124
VWS3	02 <lmxl>	212			212	na	215		215		212
											215

Danksagungen

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, besonders:

- ☞ Apl. Prof. Dr. Eva Zyprian für die Übernahme der Erstkorrektur und der steten Unterstützung bei allen Fragen.
- ☞ Dr. Rudolf Eibach für die gute Projektbetreuung und die vielen Anregungen.
- ☞ Dr. habil. Reinhard Töpfer für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof durchführen zu können und die visionären Denkanstöße.
- ☞ Dr. Achim Schmitt, Alexander Dürrhauer, Friederike Rex, Dr. Iris Fechter, Iván Carreño, Dr. Ludger Hausmann und Tina Moser für fruchtbare Diskussionen und stete Hilfsbereitschaft.
- ☞ Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor für die gute Arbeitsatmosphäre und hervorragende Zusammenarbeit.
- ☞ Eberhardt Corfier und seinen Mitarbeiter/innen für die Pflege der Pflanzen.
- ☞ Dr. Erika Maul für die ampelographischen Erkenntnisse und eine sehr hilfreiche VIVC-Datenbank.
- ☞ dem Team der Bibliothek für schnelle und umfangreiche Literaturbeschaffungen.
- ☞ Claudia Welsch für „Express“-Bestellungen und „Materialortung“ und Ulla Müller für den EDV-Support.
- ☞ Rolf Wind für die Unterstützung mit seinem riesigen technischen und methodischen Wissen und Dr. Andreas Kortekamp für seine Informationen zu Untersuchungsmethoden bei *Plasmopara*-Infektionen.
- ☞ Dr. Katia Gindro, Dr. Virginia Alonso-Villaverde und Dr. Olivier Viret für die Möglichkeit die Stilben-Analyse am Agroscope Changins-Wädenswil durchführen und erlernen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meiner Ehefrau Jessica, unseren Kindern Nick & Nele, meinen Eltern Wolfgang und Cornelia Schwander und meinen Schwiegereltern Philipp und Marietta (†) Storck. Ohne eure Unterstützung und euer Verständnis wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke!

