

**Die**  
**Untersuchung der Erkennung von *Plasmopara***  
***viticola* durch *VRP1* Rezeptoren und der**  
**Regulation der Pathogenabwehr**  
**durch die Transkriptionsfaktoren**  
**VvWRKY33 und VvERF5**  
**in der Weinrebe**  
**(*Vitis* sp.)**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht - Karls - Universität  
Heidelberg

**Patrick Merz**

**2014**



INAUGURAL - DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht - Karls - Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

**Diplom-Ingenieur (FH) Patrick Roman Merz**

**aus: 68305 Mannheim**

**Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2014**

**Die**  
**Untersuchung der Erkennung von *Plasmopara***  
***viticola* durch *VRP1* Rezeptoren und der**  
**Regulation der Pathogenabwehr**  
**durch die Transkriptionsfaktoren**  
**VvWRKY33 und VvERF5**  
**in der Weinrebe**  
**(*Vitis* sp.)**

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Rausch  
Prof. Dr. Jochen Bogs

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Summary .....</b>	<b>3</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Die Weinrebe.....</b>	<b>5</b>
2.1.1 Beerenentwicklung .....	6
<b>2.2 Der Weinbau in Europa.....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Rebsorten .....	8
2.2.1.1 `Lemberger´ .....	8
2.2.1.2 `Regent´ .....	9
<b>2.3 Krankheiten im Weinbau .....</b>	<b>10</b>
2.3.1 Falscher Mehltau .....	10
2.3.2 Echter Mehltau .....	13
<b>2.4 Resistenzzüchtung .....</b>	<b>14</b>
2.4.1 Klassische Kreuzungszüchtung .....	14
2.4.2 Markergestützte Züchtung .....	16
<b>2.5 Resistenzmechanismen.....</b>	<b>16</b>
2.5.1 Passive Abwehr .....	17
2.5.2 Basalresistenz .....	18
2.5.3 Induzierte Resistenz.....	19
<b>2.6 Struktur von NB-LRR Resistenzgenen .....</b>	<b>20</b>
<b>2.7 Beteiligung von Transkriptionsfaktorfamilien an der Genregulation in Pflanzen .....</b>	<b>22</b>
2.7.1 WRKY Transkriptionsfaktoren .....	22
2.7.2 AP2/ERF Transkriptionsfaktoren .....	24
2.7.3 CZF1/ZFAR1 Transkriptionsfaktoren .....	25
<b>2.8 Akkumulation von PR-Genen nach Pathogeninfektion.....</b>	<b>26</b>
<b>3 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>28</b>
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Charakterisierung der <i>VRPI</i> Rezeptoren aus der Weinrebe .....</b>	<b>29</b>
4.1.1 Isolierung und bioinformatische Analyse der <i>VRPI</i> Rezeptoren aus einer anfälligen und einer resistenten Rebsorte .....	30

4.1.2	Subzelluläre Lokalisation der VRP1:GFP Fusionskonstrukte in Protoplasten mittels Konfokaler Mikroskopie.....	34
4.1.3	Transkriptionelle Analyse der VRP1 Rezeptoren in Weinreben nach Inokulation mit <i>Plasmopara viticola</i> .....	35
4.1.4	Funktioneller Nachweis der VRP1 Rezeptoren gegen <i>Plasmopara viticola</i> Infektion durch transiente Transformation in <i>Vitis vinifera</i> .....	36
4.1.4.1	Etablierung der <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelten Infiltration zur transienten Expression von Kandidatengenen in der Weinrebe .....	36
4.1.4.2	Etablierung der Blattscheibeninfektion von Weinreben mit <i>Plasmopara viticola</i> .....	39
4.1.4.3	Nachweis der gesteigerten Resistenz gegen <i>Plasmopara viticola</i> nach Transformation der VRP1 Rezeptoren in Weinrebenblättern.....	41
4.1.5	Funktioneller Nachweis der VRP1 Rezeptoren gegen <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i> Infektion durch stabile Transformation in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	43
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren der Pathogenabwehr aus der Weinrebe .....</b>	<b>45</b>
4.2.1	Vergleichende Analyse von Pathogen-induzierten Promotoren.....	46
4.2.2	Induktion des <i>VvPR10.1</i> Promotors durch verschiedene Transkriptionsfaktoren .....	48
4.2.3	Analyse der ektopischen Expression ausgewählter Transkriptionsfaktoren mit anschließender <i>Plasmopara viticola</i> Infektion in der Weinrebe.....	50
4.2.3.1	Untersuchung der zeitabhängigen <i>VvWRKY33</i> Expression in infiltrierten Weinreben und dem Einfluss auf die Resistenz .....	52
4.2.3.2	Untersuchung der <i>VvWRKY33</i> Expression in infiziertem Blattgewebe und gesunden Beeren.....	54
4.2.3.3	Phylogenetische Sequenzanalyse des Transkriptionsfaktors <i>VvWRKY33</i> .....	55
4.2.4	Funktioneller Nachweis von <i>VvWRKY33</i> in <i>Arabidopsis</i> gegen Infektion mit <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i> und <i>Botrytis cinerea</i> .....	57
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>60</b>
<b>5.1</b>	<b>Beteiligung der VRP1 Rezeptoren an der Resistenz gegen <i>Plasmopara viticola</i> .....</b>	<b>60</b>
5.1.1	Die <i>in silico</i> Analyse der VRP1 Rezeptoren zeigt charakteristische Elemente für CC <sub>R</sub> -NBS-LRR Resistenzproteine auf.....	61
5.1.2	Subzelluläre Lokalisation von VRP1:GFP zeigte einen intrazellulären Rezeptor im Cytoplasma .....	62
5.1.3	Pathogenbefall induziert VRP1 Expression in der resistenten Rebsorte 'Regent' nicht in 'Lemberger' .....	64
5.1.4	Transiente Expression der VRP1 Rezeptoren in Weinrebenblättern verbessert die Resistenz gegen <i>P. viticola</i> .....	65

5.1.5	Stabile Expression der VRP1 Rezeptoren in Arabidopsis führt zu gesteigerter Resistenz gegen <i>H. arabidopsidis</i> .....	66
5.1.6	Fazit .....	67
5.1.7	Ausblick.....	67
5.1.7.1	Untersuchungen zur unterschiedlichen Regulation der VRP1 Gene nach Pathogenbefall .....	67
5.1.7.2	Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Infektionen auf die subzelluläre Lokalisierung der VRP1 Gene .....	68
<b>5.2</b>	<b>Transkriptionsfaktoren in der Signaltransduktionskette der Pathogenabwehr in der Weinrebe.....</b>	<b>69</b>
5.2.1	Der <i>VvPR10.1</i> Promotor enthält <i>cis</i> -regulative Elemente für verschiedene Transkriptionsfaktoren.....	69
5.2.2	<i>VvCZF1</i> , <i>VvERF5</i> und <i>VvWRKY33</i> induzieren <i>VvPR10.1</i> .....	70
5.2.2.1	<i>VvWRKY33</i> induziert Resistenz gegen <i>Plasmopara viticola</i> und <i>Botrytis cinerea</i> .....	71
5.2.2.2	<i>VvERF5</i> steigert die Resistenz gegen <i>Plasmopara viticola</i> im Gegensatz zu <i>VvCZF1</i> .....	73
5.2.3	Die Induktion von <i>VvPR10.1</i> in der Weinrebe korreliert mit der Resistenz gegen <i>P. viticola</i> .....	74
5.2.4	Fazit .....	76
5.2.5	Ausblick.....	76
<b>6</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>77</b>
<b>6.1</b>	<b>Pflanzenmaterial.....</b>	<b>77</b>
6.1.1	Weinreben.....	77
6.1.1.1	Anzucht von Weinreben im Gewächshaus .....	77
6.1.2	Tabak .....	78
6.1.3	Arabidopsis .....	78
6.1.4	Suspensionskulturen .....	79
6.1.5	Medien.....	79
<b>6.2</b>	<b>Mikrobiologische Techniken .....</b>	<b>79</b>
6.2.1	Bakterienstämme .....	79
6.2.1.1	<i>Escherichia coli</i> .....	79
6.2.1.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	80
6.2.2	Herstellung kompetenter Zellen .....	80
6.2.3	Transformation .....	81
6.2.4	Lagerung.....	81
<b>6.3</b>	<b>DNA Techniken .....</b>	<b>82</b>

6.3.1	Klonierung der Promotoren / Transkriptionsfaktoren / Rezeptoren .....	82
6.3.2	Oligonukleotide .....	82
6.3.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	86
6.3.4	Agarosegelelektrophorese.....	86
6.3.5	PCR Aufreinigung .....	87
6.3.6	Isolierung von Plasmid DNA.....	87
6.3.7	DNA Quantifizierung .....	88
6.3.8	Restriktionsverdau .....	88
6.3.9	Ligation und Rekombination .....	88
6.3.10	Sequenzierung .....	89
6.3.11	Quantitative Echt-Zeit PCR (qRT-PCR / qPCR).....	89
<b>6.4</b>	<b>RNA Techniken .....</b>	<b>89</b>
6.4.1	Isolation von RNA aus Pflanzengewebe .....	89
6.4.2	RNA Quantifizierung.....	90
6.4.3	Agarosegelelektrophorese.....	90
6.4.4	Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR) .....	90
<b>6.5</b>	<b>Pflanzentransformation .....</b>	<b>91</b>
6.5.1	Biolistische Transformation (Gene Gun).....	91
6.5.2	Elektrische Transformation (Elektroporation).....	91
6.5.3	Agrobakterien-vermittelte Transformation.....	92
6.5.3.1	Floral-Dip .....	92
6.5.3.2	Vakuum Infiltration .....	93
<b>6.6</b>	<b>Infektionen .....</b>	<b>94</b>
6.6.1	Falscher Mehltau .....	94
6.6.1.1	<i>Plasmopara viticola</i> .....	94
6.6.1.2	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i> .....	95
6.6.2	Echter Mehltau .....	95
6.6.2.1	<i>Erysiphe necator</i> .....	95
6.6.3	Grauschimmel.....	95
6.6.3.1	<i>Botrytis cinerea</i> .....	95
<b>6.7</b>	<b>Bioinformatik.....</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>Eigene Publikationen .....</b>	<b>116</b>
<b>10</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>117</b>

# 1 Zusammenfassung

Die Weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*) gehört zu den bedeutendsten Kulturpflanzen weltweit. Ihre hohe Anfälligkeit für eine Vielzahl von Pathogenen, insbesondere dem Echten (*Erysiphe necator*) und Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*), ist für den Weinbau eine besondere wirtschaftliche Bedrohung und kann zu erheblichen Ernteaufschlägen führen. Nicht zuletzt darum werden in Europa zwei Drittel der Gesamtmenge an Fungiziden im Weinbau eingesetzt. Um den Fungizideinsatz zu reduzieren, sollen neue resistente Rebsorten (z.B. 'Regent') gezüchtet werden, wobei es sich bei der angewendeten klassischen Kreuzungszüchtung um ein langwieriges Verfahren handelt.

Die Mechanismen, welche in den resistenten Rebsorten die gesteigerte Resistenz vermitteln, sind jedoch größtenteils unbekannt. Die Identifikation sowie die funktionelle Charakterisierung von Genen, welche an der Regulation von Resistenzmechanismen beteiligt sind, könnte somit zur Verbesserung und Beschleunigung der Züchtung neuer resistenter Rebsorten beitragen. Mittels Mikroarrays konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, darunter auch Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren (TF), welche in resistenten Rebsorten im Vergleich zu anfälligen Rebsorten eine schnellere und stärkere Induktion zeigten, von denen aber bislang nur vereinzelte Gene funktionell charakterisiert werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die Funktion einer Rezeptorfamilie bei der Abwehr von *P. viticola* nachgewiesen sowie anschließend die Unterschiede der transkriptionellen Regulation der Resistenzantwort durch TFs zwischen einer anfälligen und einer resistenten Rebsorte untersucht.

Hierzu wurden im ersten Teil des Projektes die Gene der *VRP1* (*Vitis Resistance to Plasmopara 1*) Rezeptorfamilie charakterisiert. Der *in silico* Vergleich der drei chimären *VRP1* Rezeptoren zwischen der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' und der resistenten Rebsorte 'Regent' zeigte keine Sequenzunterschiede. Die Lokalisation der *VRP1* Proteine nach Fusion mit dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) in Protoplasten einer Suspensionskultur (*V. vinifera* cv. 'Chardonnay') mittels konfokaler Mikroskopie konnte belegen, dass sich alle drei *VRP1* Konstrukte im Cytoplasma befanden. Zusätzlich konnte mittels qPCR Analyse nachgewiesen werden, dass die Rezeptoren im resistenten 'Regent' im Vergleich zum anfälligen 'Lemberger', spezifisch durch Infektion mit *P. viticola* induziert wurden, was auf eine Funktion bei der Abwehr von *P. viticola* schließen lässt. Die transiente Transformation der *VRP1* Gene in Weinrebenblätter mit anschließender *P. viticola* Infektion zeigte, dass die Expression von *VRP1-3* eine Steigerung der Resistenz um bis zu 50 % bewirkte. Darüber hinaus wurden die *VRP1* Gene stabil in *Arabidopsis thaliana* transformiert. In Folge der Überexpression von *VRP1-3* konnte ebenfalls eine Verbesserung der Resistenz der transgenen *Arabidopsis* Pflanzen gegen *Hyaloperonospora arabidopsidis* um bis zu 50 % detektiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Induzierbarkeit des Resistenzgens *VvPR10.1* (*Pathogenesis Related 10.1*) durch TFs und ihre Auswirkung auf die Resistenz untersucht. Mittels Promotor

Induktionsanalyse konnte gezeigt werden, dass die TFs *VvWRKY33*, *VvERF5* und *VvCZF1* den Promotor von *VvPR10.1* induzieren konnten, was auf eine Rolle in der Abwehr hindeutete. Es konnte zusätzlich *in vivo* gezeigt werden, dass eine durch *P. viticola* Infektion hervorgerufene Induktion von *VvWRKY33* in Weinrebenblättern von Gewächshausreben wiederum zur Steigerung der Expression von *VvPR10.1* führte. Ektopische Expression der TFs in Weinrebenblättern mit anschließender *P. viticola* Infektion zeigte, dass die Expression von *VvWRKY33* und *VvERF5* eine Steigerung der Resistenz um 50-70 % bewirkte. Außerdem konnte durch Komplementierung der *A. thaliana* knock-out Mutante *wrky33-1* mit *VvWRKY33* nachgewiesen werden, dass die Expression im heterologen System Arabidopsis den Phänotyp des Wildtyps, in Bezug auf die Resistenz, wiederherstellen konnte. Darüber hinaus konnte sogar eine signifikante Steigerung der Resistenz gegen *H. arabidopsidis* und *Botrytis cinerea* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 erreicht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass die gezielte Expression des VPR1-3 Rezeptors sowie der TFs *VvWRKY33* bzw. *VvERF5* in der Weinrebe, eine gesteigerte Resistenz gegen *P. viticola* induzieren konnten. Dies stellt eine Basis für die Aufklärung der zugrunde liegenden Resistenzmechanismen, und somit für die Entwicklung neuer molekularer Marker zur Verbesserung und Beschleunigung der Züchtung neuer resistenter Rebsorten, dar.

## 1.1 Summary

Grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*) is one of the most important crop species in the world. Its high susceptibility to a large number of pathogens especially powdery (*Erysiphe necator*) and downy mildew (*Plasmopara viticola*) is a special economic threat for viticulture and can lead to substantial crop losses. Two-thirds of the total amount of fungicides in Europe are used in viticulture not least because of this fact. In order to reduce the application of fungicides new resistant cultivars (e.g. 'Regent') should be bred, however, the use of classical cross-breeding is a time consuming procedure. Mechanisms which mediate improved resistance in the resistant cultivars are to a great extent unknown. The identification as well as the functional characterization of genes involved in the regulation of resistance mechanisms could therefore help to improve and advance breeding of new resistant cultivars. Using Microarrays a number of genes including receptors and transcription factors (TF) could be identified which showed a faster and higher induction in resistant cultivars compared to susceptible cultivars, but only a few of these genes could be functionally characterized so far. Therefore, in this project the function of a receptor family in the defence against *P. viticola* could be proven and also the differences in the transcriptional regulation of the defence response by TFs has been investigated between a susceptible and a resistant cultivar.

In the first part of the project the genes of the *VRP1* (*Vitis resistance to Plasmopara 1*) receptor family have therefore been characterized. The *in silico* comparison of the three chimeric *VRP1* receptors between the susceptible cultivar 'Lemberger' and the resistant cultivar 'Regent' showed no sequence differences. The localization of the *VRP1* proteins in protoplasts of a grapevine suspension cell culture (*V. vinifera* cv. 'Chardonnay') by using confocal microscopy after fusion with the green fluorescent protein (GFP) was able to demonstrate that all three *VRP1* constructs were located in the cytoplasm. In addition, qPCR analysis detected that the receptors were specifically induced by infection with *P. viticola* in resistant 'Regent' compared to susceptible 'Lemberger', which was indicative of a function in the defence against *P. viticola*. Transient transformation of *VRP1* genes into grapevine leaves with subsequent *P. viticola* infection revealed that the expression of *VRP1-3* achieved an increase of resistance by up to 50 %. Additionally, the *VRP1* genes were stably transformed into *Arabidopsis thaliana*. As a result of *VRP1-3* overexpression the improved resistance of the transgenic *Arabidopsis* plants against *Hyaloperonospora arabidopsidis* up to 50 % could be detected.

In the second part of the project, the inducibility of the resistance gene *VvPRI0.1* (*Pathogenesis Related 10.1*) was investigated by TFs and their effect on the resistance. Using promoter induction analysis it could be shown that the TFs *VvWRKY33*, *VvERF5* and *VvCZF1* could induce the promoter of *VvPRI0.1*, indicating a function in defence. It was additionally shown *in vivo* that an induction of *VvWRKY33* in grapevine leaves of greenhouse plants caused by *P. viticola* infection led to an increase in the expression of *VvPRI0.1*. Ectopic expression of the TFs in grapevine leaves followed by *P. viticola* infection showed that the expression of *VvWRKY33* and *VvERF5* caused an increase in

resistance by 50-70 %. In addition, complementation of the *A. thaliana* knock-out mutant *wrky33-1* with *VvWRKY33* confirmed that the expression in the heterologous system *Arabidopsis* could restore the resistance phenotype of the wild-type. Moreover, it was even possible to achieve a significant increase in resistance to *H. arabidopsidis* and *Botrytis cinerea* compared to Col-0 wild-type.

In the course of this thesis could be proven for the first time that the specific expression of the VRP1-3 receptor and the TFs *VvWRKY33* or *VvERF5* in grapevine, induced an increased resistance to *P. viticola*. This provides a basis for the elucidation of the underlying mechanisms of resistance, and thus for the development of new molecular markers to improve and advance the breeding of new resistant grapevine cultivars.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Weinrebe

Die Weinrebe gehört zur Familie der *Vitaceae*, die in 17 Gattungen unterteilt werden kann. Die kommerziell genutzten Weinreben gehören alle zur Gattung *Vitis*. Mehr als 70 verschiedene *Vitis* Spezies wurden bisher beschrieben. Auf Grundlage der weltweiten geographischen Verteilung können alle Spezies drei Hauptgruppen (Eurasien, Amerika und Asien) zugeordnet werden (Terral et al., 2009). Die Eurasische Gruppe *Vitis vinifera* L. kann auf Grund morphologischer Unterschiede in drei weitere Untergruppen unterteilt werden. Es handelt sich um die beiden Wildarten ssp. *sylvestris* Gmel und ssp. *caucasica* Vav. sowie die Kulturform ssp. *sativa/vinifera* (Levadoux, 1956; Zohary, 2004). *Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera* stellt hierbei die ökonomisch wichtigste Kulturform dar, aus der bisher etwa 5000 Kultivare gezüchtet wurden (Ali et al., 2010). Obwohl sich die Weinrebe sehr gut an trockenes Klima sowie Frost im Winter angepasst hat und weltweit verbreitet ist, ist der Anbau fast ausschließlich in der nördlichen Hemisphäre zu finden (Vivier und Pretorius, 2000).

*V. vinifera* L. ist diploid ( $2n = 38$ ) und hat eine Genomgröße von 475-500 Megabasenpaaren (Mb), die auf 19 Chromosomen / Kopplungsgruppen verteilt sind (Kobel, 1929; Olmo, 1937). Da das Genom im Vergleich zu anderen Nutzpflanzen wie Apfel, Tomate oder Getreide relativ klein ist, ist es für wissenschaftliche Untersuchung sehr interessant (Campos-de Quiroz, 2002) und wird bereits seit Anfang des Jahrhunderts untersucht (Dorsey, 1914). Der Anteil an kodierenden Sequenzen beträgt etwa 3,8 %, wohingegen die übrige DNA hauptsächlich aus repetitiven und nicht kodierenden DNA Sequenzen besteht (Lodhi und Reisch, 1995). Zusätzlich verfügt das Genom über eine Vielzahl an Retrotransposons zweier unterschiedlicher Typen in hoher Kopienzahl (Böhm und Zyprian, 1998).

Mit der Sequenzierung der fast vollständig homozygoten Inzuchtlinie cv. 'Pinot Noir' (PN40024) im Jahr 2007 begann ein neues Zeitalter der Resistenzzüchtung (Jaillon et al., 2007). Die aktuelle 12X v1 Zusammenstellung der Sequenzdaten deutet auf eine Genomgröße von 475 Mb hin und konnte ~26.346 potentielle Gene identifizieren (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>) (Jaillon et al., 2007). Zusätzlich hierzu werden im Rahmen des Gene Index Project (TGI) im DFCI Grape Gene Index (VvGI) Sequenzdaten zur Weinrebe zur Verfügung gestellt. Dieses Projekt verwendet Expressed Sequence Transcripts (ESTs) und Gensequenzen, um mit Hilfe von Referenzgenomen die Existenz der Gene zu beweisen und Informationen über ihre Funktion zu sammeln (Quackenbush et al., 2000). Für die Weinrebe sind bisher 375.238 ESTs verfügbar, die mit Hilfe der BLAST Suchfunktion und Tentative Consensus (TC) Sequenzen kommentiert wurden. Hierbei konnte das Vorhandensein großer Genfamilien wie Transkriptionsfaktorfamilien (MYB, WRKY, ERF, CZF) und Resistenzgenfamilien (PR-Gene) detektiert werden. Die Weinrebe war die

vierte Blütenpflanze (*Magnoliopsida*), das zweite Gehölz und die erste Obstart die vollständig sequenziert wurde (Jaillon et al., 2007).

Obwohl das Genom einer gegen viele Krankheiten anfälligen Rebsorte publiziert wurde, können diese Daten dennoch die Resistenzzüchtung positiv beeinflussen, da auf ihrer Grundlage Gene und Gen-Cluster mit Homologien zu bereits beschriebenen Resistenzgenen von anderen Pflanzen identifiziert werden können. Die Analyse von Regionen eines quantitativen Merkmals (Quantitative Trait Loci (QTL)) konnte bereits zuvor QTLs ermitteln, die eine Resistenz gegen Krankheiten vermittelten (Fischer et al., 2004). Da nun die Lokalisation von QTLs innerhalb des Genoms mit Hilfe der Sequenzdatenbanken möglich ist, können die Allele die für die Resistenz verantwortlich sind relativ schnell identifiziert werden. Jedoch ist davon auszugehen, dass die Analysen von Allelunterschieden nicht ausreichen werden, um alle Resistenzgene im *V. vinifera* Genom zu identifizieren. Gene die sich in den amerikanischen und asiatischen Wildarten durch die Coevolution entwickelt haben, können hierdurch beispielsweise nicht identifiziert werden. Daher müssen zusätzlich andere Strategien entwickelt werden, um die restlichen Quellen der Resistenz zu ergründen.

### 2.1.1 Beerenentwicklung

Die Beeren der Weinrebe folgen während ihrer Entwicklung einem doppelt sigmoiden Wachstumsmuster, welches in zwei verschiedene Wachstumsphasen, unterbrochen durch eine Rebsortenspezifische Verzögerungsphase, unterteilt werden kann (Coombe, 1992; Conde et al., 2007). Die erste Wachstumsphase beginnt mit der Blüte und endet etwa neuen Wochen nach der Blüte. Diese Phase ist gekennzeichnet durch Zellteilung und Expansion zur Produktion von Fruchtfleisch und Samenembryos. Einige lösliche Stoffe wie Phytohormone (vor allem Auxine, Gibberelline und Cytokinine), Aminosäuren, Spurenelemente und Aromastoffe akkumulieren bereits innerhalb der ersten Wachstumsphase,. Die zweite Wachstumsphase fängt mit dem Beginn der Beerenreife (Véraison) an und zeichnet sich vor allem durch Expansion der vorhandenen Perikarpzellen und durch einen starken Anstieg an Wasser, Glukose und Fruktose aus (Hardie et al., 1996). Abscisinsäure (ABA) und Brassinosteroide akkumulieren während der Reifung, wohingegen Ethylen (ET) konstant bleibt, was wiederum charakteristisch für nicht-klimakterische Früchte wie die Weinrebe ist (Conde et al., 2007). Während der Reifung verdoppeln die Beeren in etwa ihre Größe und ändern ihre Beschaffenheit von klein, hart und sauer mit wenig Zucker zu groß, weich, süß mit hohen Anteilen an Farb- und Aromastoffen (Robinson und Davies, 2000).

In gesunden Beeren werden Abwehr- und Stressgene welche für PR Proteine wie Chitinasen, Thaumatin-ähnliche Proteine, Stilbensynthasen oder Ribonukleasen kodieren, während der Beerenreife unterschiedlich exprimiert (Robinson et al. 1997; Salzman et al. 1998). Eine generelle Hochregulation mit Beginn der Véraison konnte festgestellt werden und die Expression nimmt mit

fortschreitender Reife (Zuckereinlagerung) immer weiter zu (Robinson et al., 1997). Der Anstieg an Zucker und Nährstoffen in den Beeren mit Beginn der *Véraison* erhöht kontinuierlich das Risiko einer Pathogeninfektion durch Fäulniserreger (Terrier et al. 2005; Lijavetzky et al. 2012). Jedoch konnten frühere Untersuchungen belegen, dass diese Induktion und Expression von PR-Genen mit und während der Beerenentwicklung nicht mit der Induktion die durch Pathogene ausgelöst wird zusammenhängt, sondern entwicklungsabhängig kontrolliert und durch Fruchtreifesignale induziert wird (Fils-Lycaon et al. 1996; Davies und Robinson 2000; Pilati et al. 2007; Colas et al. 2012).

## 2.2 Der Weinbau in Europa

Die Weinrebe (*Vitis* sp.) gehört zu den ökonomisch wichtigsten Kulturpflanzen weltweit. 2012 betrug die gesamte bestockte Rebfläche aller Anbauländer etwa 7,528 Millionen Hektar. Auf dieser Fläche wurden rund 69,1 Millionen Tonnen Trauben abgeerntet und für die Weinproduktion, wie auch andere Produkte verwendet. Hieraus wurden 252 Millionen Hektoliter Wein hergestellt und der weltweite Konsum lag 2012 bei 243 Millionen Hektolitern. Auf Grund des hohen Bedarfs wurde mit Wein 2012 ein Umsatz von 25,290 Milliarden Euro erzielt (International Organisation of Vine and Wine, 2012).

Obwohl Europa mehr als die Hälfte der weltweit bestockten Rebfläche besitzt, trägt die europäische Traubenerzeugung nur zu 44 % zur gesamten Produktion bei. In Asien werden rund ein Drittel (28,7 %) und in Amerika noch immerhin noch ein Fünftel (21 %) der Trauben produziert, gefolgt von Afrika (5,9 %) und Ozeanien (3 %). Dafür entfallen immer noch knapp zweidrittel der weltweiten Weinerzeugung auf Europa (62,3 %) (International Organisation of Vine and Wine, 2012). Alle international anerkannten Rebsorten gehören zur Familie *V. vinifera* ssp. *vinifera* und werden im Allgemeinen als Weinreben oder Europäische Weinreben bezeichnet. Auf Grund ihres hohen Potentials für die Produktion von qualitativ hochwertigem Wein werden die *V. vinifera* Rebsorten auf der ganzen Welt angebaut (This et al., 2006). Auch wenn die amerikanischen und asiatischen Wildreben eine bedeutende Quelle landwirtschaftlich wichtiger Eigenschaften wie Resistenzen gegen biotischen und abiotischen Stress darstellen, lässt sich mit diesen Reben im Vergleich zur europäischen Weinrebe nur ein minderwertiger Wein herstellen (Di Gaspero et al., 2012). Daher wurde der Anbau amerikanischer und asiatischer Weinreben in Europa sogar gesetzlich verboten.

Das große Problem der europäischen *V. vinifera* Rebsorten ist die mehr oder weniger hohe Anfälligkeit gegen die beiden weltweit wichtigsten Krankheiten, den Falschen und Echten Mehltau auf Grund der fehlenden Coevolution mit diesen Pathogenen. Epidemien der beiden obligat biotrophen Pathogene führen regelmäßig zu hohen Verlusten bei der Weinqualität und dem Ertrag. Hinzu kommt noch die Anfälligkeit gegen eine ganze Reihe weiterer Pathogene die in Europa immer weiter auf dem Vormarsch sind (Figueiredo et al., 2012). Um die Weinreben hiergegen zu schützen sind unverhältnismäßige Fungizidmengen notwendig. Obwohl die Weinrebe nur auf etwa 3 % der

europäischen Agrarflächen angebaut wird, wurden 1994-2003 mehr als 66 % aller eingesetzten Fungizide für die Bekämpfung von Pilzkrankheiten im Weinbau eingesetzt (Muthmann et al., 2007). Allen Pflanzenschutzmitteln ist gemeinsam, dass sie für Mensch und Umwelt eine große Belastung darstellen. Die zunehmende Anreicherung von Schwermetallen (vor allem Kupfer) in den Böden erzeugt bei den Weinreben selbst phytotoxische Effekte (Vogt und Götze, 1987) und führt zur Qualitätsminderung des Weins (Weiss, 1992).

Deshalb stellt die Züchtung neuer resistenter Rebsorten die beste Alternative zur Verhinderung von Ernteaussfällen durch Pathogene dar. Das Wissen über die Resistenzmechanismen, welche für die Abwehr von verschiedenen Pathogenen in der Weinrebe notwendig sind, ist daher ein zwingend notwendiges Hilfsmittel zur Züchtung neuer resistenter Rebsorten.

## 2.2.1 Rebsorten

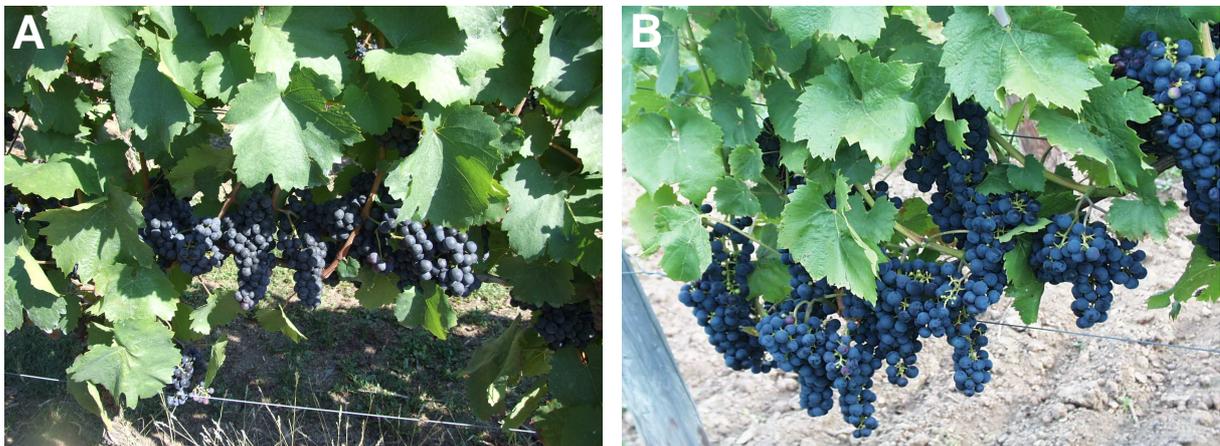
Wein ist bereits seit der Antike ein wichtiger Teil der menschlichen Kultur (Thomas et al., 1993). *Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera* stellt die ökonomisch wichtigste Kulturform der Weinrebe zur Weinproduktion dar, aus der bisher etwa 5000 verschiedene Rebsorten hervorgegangen sind (Ali et al., 2010). Da die europäische Weinrebe äußerst anfällig gegen eine Vielzahl von Pathogenen ist, werden immer häufiger neue Rebsorten durch Einkreuzung amerikanischer oder asiatischer Wildarten mit anschließender Rückkreuzung mit europäischen Weinreben gezüchtet. Der Fokus dieser Arbeit lag auf dem Vergleich der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' mit der resistenten Neuzüchtung 'Regent'.

### 2.2.1.1 'Lemberger'

Die rote Rebsorte 'Lemberger' (**Abbildung 2.1A**) wird auch als 'Blaufränkisch' oder 'Blauer Limberger' bezeichnet. Es handelt sich um eine autochthone österreichische Rebsorte die als 'Blaufränkisch' in Österreich erstmals im 18. Jahrhundert nachgewiesen wurde. Da die Rebsorte im Ort Limberg in Niederösterreich vorkam, wurde Sie nach dem Auftauchen in Deutschland als 'Limberger' bezeichnet. Ein Elternteil stellt die Rebsorte 'Heunisch' dar, die bis Mitte des 19. Jahrhunderts in Europa weit verbreitet war und eine beliebte Kreuzungssorte darstellte. Beim anderen Elternteil wird eine alte Fränkische Rebsorte vermutet. Trotz fortschreitender DNA Analysetechniken konnte die genaue Herkunft bislang nicht geklärt werden. Bei der Rebsorte 'Lemberger' handelt es sich um eine fast ausschließlich in Württemberg und Baden angebaute Rebsorte (Bundessortenamt, 2008). Obwohl 'Lemberger' 2008 nur als mäßig anfällig für Mehltau eingestuft wurde, lässt sich heute eine sehr starke Anfälligkeit gegen Mehltaupathogene feststellen.

### 2.2.1.2 `Regent`

Die pilzwiderstandsfähige rote Rebsorte `Regent` (**Abbildung 2.1B**) wurde 1967 von Gerhard Alleweldt am Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen gezüchtet und 1995 in die Sortenliste eingetragen (Eibach und Töpfer, 2003). Nachdem die Zulassung in allen deutschen Weinanbaugebieten erfolgt war, erlebte der Anbau von `Regent` eine sehr schnelle Flächenzunahme. `Regent` repräsentiert immer noch die wichtigste und verbreitetste pilzwiderstandsfähige Rebsorte und stellt die sechst wichtigste Rotweinsorte Deutschlands, noch vor `Lemberger` dar (Lott et al., 2010; Ambrosi et al., 2011). Regent ist eine Kreuzung zwischen Diana (Silvaner x Müller-Thurgau) x Chambourin und zeigt eine gute Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Falschen Mehltau (Basler, 2003). Die in `Regent` vorhandenen Resistenzen stammen aus früh eingekreuzten amerikanischen Wildarten. Der angebliche „Hybridton“, der bei resistenten Neuzüchtungen der ersten Generation noch wahrnehmbar und als unerwünschtes Erbe der „Amerikanerreben“ verurteilt wurde, führte zu zögerlicher Akzeptanz moderner resistenter Sorten (Hajdu, 2000). Der Fehlton konnte allerdings im Verlauf der Züchtung erfolgreich unterdrückt werden. Im Vergleich zu klassischen Rebsorten sind deutlich weniger bis gar keine Pflanzenschutzmaßnahmen erforderlich. Obwohl im Verlauf der Sortenentwicklung viele Kenntnisse gewonnen werden konnten, sind die genetischen Grundlagen der Pilzresistenz von `Regent` noch nicht bekannt.



**Abbildung 2.1: Rebstockansicht mit Trauben und Blättern**

(A) *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* cv. `Lemberger` (B) *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* cv. `Regent`  
Fotos aus dem Archiv des DLR Rheinpfalz, Neustadt (Gerd Götz)

## 2.3 Krankheiten im Weinbau

*Vitis vinifera* ist auf Grund ihres hohen Potentials zur Erzeugung von qualitativ hochwertigen Weinen die am meisten kultivierte Weinrebe weltweit. Jedoch ist sie hoch anfällig für eine ganze Reihe an Krankheiten. Pilzkrankheiten sind das Hauptproblem beim weltweiten Anbau von Weinreben. Man kann unterscheiden zwischen Blattkrankheiten wie Echter Mehltau (*Erysiphe necator*) und Falscher Mehltau (*Plasmopara viticola*) und die Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*), sowie Beerenkrankheiten wie der Grauschimmel (*Botrytis cinerea*) und Holzkrankheiten zu denen auch die Eutypiose (*Eutypa lata*), die Schwarzfleckenkrankheit (*Phomopsis viticola*) und Esca (Krankheits- und Erregerkomplex aus v.a. *Phaeomonniella chlamydospora* und *Phaeoacremonium aleophilum* sowie *Botryosphaeria* ssp., *Cylindrocarpon* und weitere Pathogene) gehören. Hinzu kommen auch noch Viruskrankheiten wie die Reisingkrankheit (GFLV, *grapevine fanleaf virus*) und Bakterienkrankheiten wie die Mauke (*Agrobacterium vitis*). Außerdem werden die Weinreben zusätzlich noch von einer ganzen Reihe an Parasiten wie der Reblaus (*Daktulosphaira vitifoliae*), der Kräuselmilbe (*Calepitrimerus vitis*) oder auch Nematoden (*Turbatrix aceti*) besiedelt (Altmayer et al., 2013).

Die gefährlichsten Krankheiten stellen allerdings der Echte und Falsche Mehltau dar, die im 19. Jahrhundert mit den amerikanischen Wildarten zusammen nach Europa eingeschleppt wurden (Galet, 1977). Insgesamt lässt sich sagen, dass Pilzinfektionen die Erntemenge drastisch reduzieren und sowohl die Beeren wie auch die Weinqualität stark negativ beeinflussen können. Um dem entgegenzuwirken werden großflächig hohe Mengen Fungizide eingesetzt. Die hohen Kosten und die negativen Auswirkungen auf die Umwelt führen verstärkt zur Suche nach Alternativen, vor allem durch die Manipulation der Resistenzmechanismen in den Pflanzen (Ferreira et al., 2004).

### 2.3.1 Falscher Mehltau

*Plasmopara viticola* (Berk. and Curtis) Berl. et de Toni (1888) gehört zu den *Oomyceten* und verursacht an der Weinrebe den Falschen Mehltau. *P. viticola* wird oft fälschlicherweise als Pilz bezeichnet. Allerdings besteht seine Zellwand nicht aus Chitin wie bei echten Pilzen, sondern aus Cellulose. Zu Beginn seiner Entdeckung wurde das Pathogen auch *Peronospora* genannt und später in *Plasmopara* umbenannt (Kober, 1993). *P. viticola* wurde versehentlich nach Europa eingeschleppt, als reblausresistente Unterlagssorten aus Amerika zur Bekämpfung der Reblausplage nach Europa eingeführt wurden (Börner, 1983). Höchstwahrscheinlich wurden die aus Nordamerika stammenden Reben damals eingeschifft, um die von der Reblaus (*Daktulosphaira vitifoliae*) zerstörten Weinberge neu zu bepflanzen. Jedoch breitete sich der Falsche Mehltau als Folge epidemieartig in allen europäischen Weinbauländern aus, wodurch die Anbaufläche in den betroffenen Ländern drastisch zurückging (Gessler et al., 2011). Die Ursache hierfür liegt in der Tatsache, dass alle europäischen

Rebsorten hoch anfällig gegenüber dem Falschen Mehltau sind. Im Gegensatz zu den amerikanischen Rebsorten wie beispielsweise der Felsenrebe *Vitis rupestris* oder der Uferrebe *Vitis riparia* durchliefen sie keine Coevolution mit *P. viticola* und haben demzufolge keine Abwehrmechanismen entwickeln können. Seit dessen Einführung 1875 hat sich *P. viticola* zu einem der schwerwiegendsten Pathogene im Weinbau entwickelt, das in Abhängigkeit vom Klima jedes Jahr in unterschiedlicher Intensität vorkommt und große Ernteaufschläge verursacht (Kober, 1993).

*P. viticola* lebt als obligat biotropher Endoparasit lediglich auf lebenden Reorganen und vollzieht einen Großteil seines Lebenszyklus innerhalb des Pflanzengewebes (Bellin et al., 2009). Bei anfälligen Rebsorten, wie 'Lemberger', kann der Befall sogar bis zum kompletten Blattverlust der Pflanze führen. Werden die Gescheine befallen, wird die Blüte zerstört und der Ertrag somit erheblich vermindert. Beim Befall von Beeren, schrumpfen diese zusammen und bilden eine lederartige Struktur aus. Diese „Lederbeeren“ sind für die spätere Weinproduktion unbrauchbar (Mohr et al., 2005). Die minimalen Bedingungen für die Entwicklung von *P. viticola* sind Triebe von 10 cm Länge, Regenfälle mit 10 mm und Mindesttemperaturen von 10 °C. Durch diese Anforderungen lassen sich allerdings auch sehr gut Prognosemodelle für den Rebschutz erstellen (Heitefuss, 1987). Das Pathogen kann sowohl einen sexuellen wie auch einen asexuellen Lebenszyklus durchlaufen.

Der sexuelle (**Abbildung 2.2**, roter Kreis) oder auch primäre Zyklus beginnt meist ab Ende August. Durch das Zusammentreffen zweier unterschiedlicher Paarungstypen des heterothallischen Myzels entstehen Antheridien und Oogonien, welche durch Verschmelzung und sexuelle Rekombination eine Oospore zur Überwinterung bilden. In ihrer Überwinterungsform sind sie sogar in der Lage über mehrere Jahre hinweg im Boden zu überleben. Bei ausreichender Bodenfeuchte und Temperaturen über 8 °C beginnt dann im Frühling die Keimung der Spore. Während dieses Vorgangs wird das Primärsporangium gebildet, welches bis zu 60 diploide Zoosporen hervorbringen kann. Diese besitzen eine Flimmer- und eine Peitschengeißel mit denen sie in der Lage sind sich zu den Spaltöffnungen zu bewegen.

Für den asexuellen Lebenszyklus (**Abbildung 2.2**, grüner Kreis) heften sich die aus den Sporangien geschlüpften Zoosporen bei anfälligen und resistenten Rebsorten an die Spaltöffnungen (Stomata). Nachdem sich die Zoosporen angeheftet und ihre Geißeln abgeworfen haben, enzystieren sie sich und bilden ihren Keimschlauch aus, um in die Atemhöhle der Stomata einzudringen. In der nächsten Infektionsphase wird ein substomatäres Vesikel gebildet aus dem die Primärhyphen hervorgehen. Das entstandene Myzel wächst intrazellulär im Schwammparenchym weiter (Unger et al., 2007). Um die Nährstoffaufnahme sicherzustellen bildet der Pilz Haustorien (Polesani et al., 2010), welche beim Fortschreiten der Parasitierung eine Aufhellung der Blattoberseite (sogenannte Ölflecken) zur Folge haben. Erst die Ausbreitung der Sekundärhyphen im Schwammparenchym wird bei resistenten Rebsorten wie 'Regent' durch Nekrosen verhindert, wohingegen sich diese bei anfälligen Rebsorten wie 'Lemberger' fast ungehindert ausbreiten können (Polesani et al., 2010).

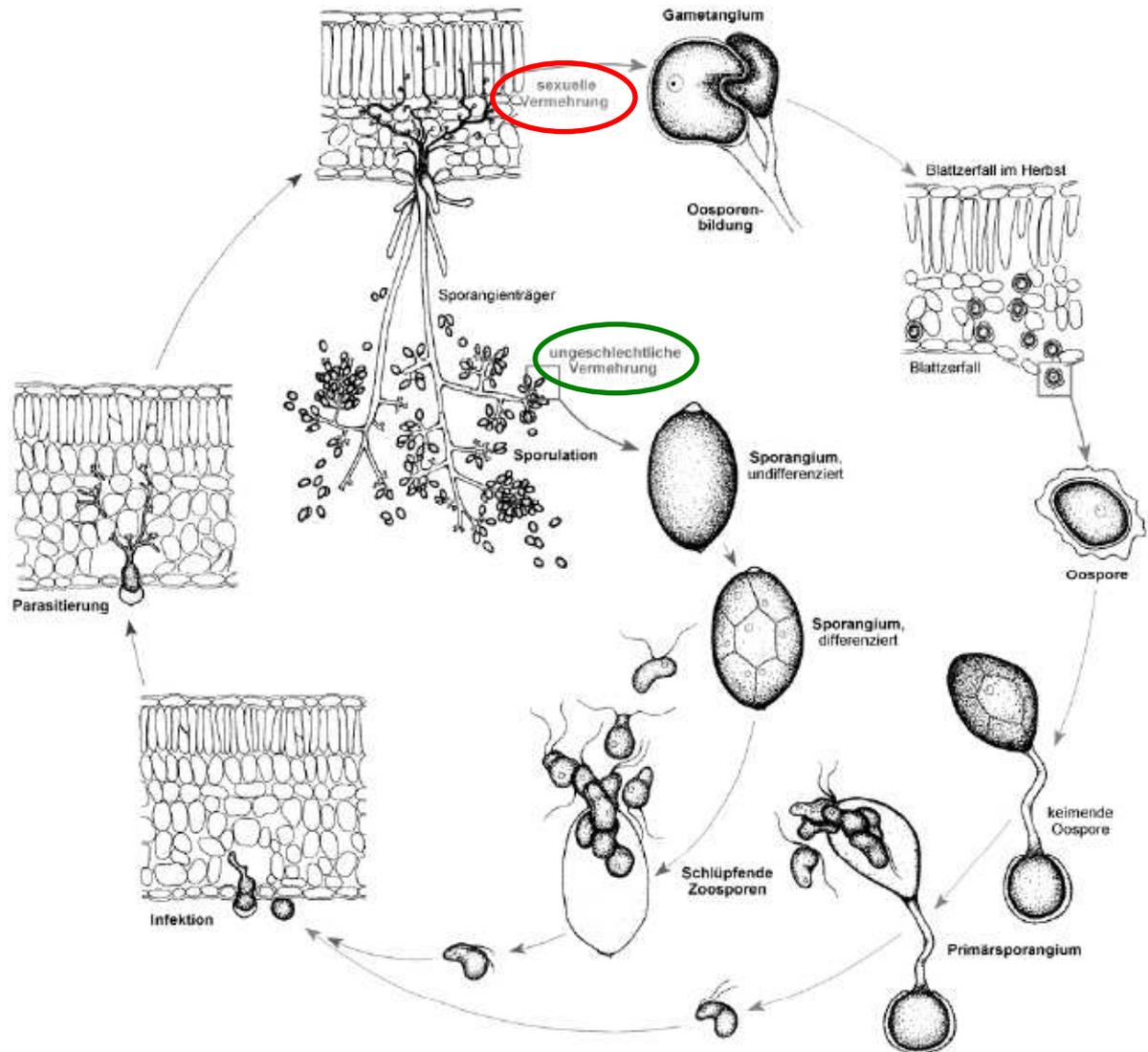


Abbildung 2.2: Sexueller und asexueller Lebenszyklus des Erregers des Falschen Mehltaus *Plasmopara viticola* (nach Schöpe, Weinbauinstitut Freiburg).

Nach Ablauf der Inkubationszeit, dem Zeitraum von der Infektion bis zum Sichtbarwerden der ersten Ölflecken, ist eine Sporulation möglich. Hierbei treten Sporangiothoren aus den Stomata heraus, welche als weißer Rasen auf der Blattunterseite erkennbar sind.

### 2.3.2 Echter Mehltau

*Erysiphe necator* [syn. *Uncinula necator* (Schw.) Burr.] (anamorph *Oidium tuckeri*) (Braun und Takamatsu, 2000) gehört zu den *Ascomyceten* und verursacht an der Weinrebe den Echten Mehltau. *E. necator* wurde genau wie *P. viticola* versehentlich nach Europa eingeschleppt, als reblausresistente Unterlagssorten aus Amerika zur Bekämpfung der Reblausplage nach Europa eingeführt wurden (Börner, 1983). Seit dessen Einführung 1851 hat sich auch *E. necator* zu einem der schwerwiegendsten Pathogene im Weinbau entwickelt.

*E. necator* lebt als obligat biotropher Ektoparasit auf der Oberfläche grüner Rebteile (Mohr, 2005). 1845 wurde er zuerst aus Nordamerika nach England eingeschleppt und verbreitete sich von dort aus schließlich über Frankreich epidemieartig in ganz Europa (Gadoury et al., 2012). Die Folge waren enorme Ernteausfälle und Qualitätseinbußen und dadurch hohe finanzielle Verluste. Die Ursache dafür liegt wiederum darin, dass die europäischen Sorten gegenüber dem Echten Mehltau ein nur geringes, bzw. kein Resistenzpotenzial auf Grund der fehlenden Coevolution besitzen (Feechan et al., 2011). Der Echte Mehltau wird im Vergleich zum Falschen Mehltau global betrachtet als gefährlicher und ökonomisch bedeutsamer eingestuft, da er weder bestimmte Feuchtigkeitsverhältnisse noch bestimmte Temperaturen zur Infektion benötigt (Dry et al., 2010; Feechan et al., 2011). Das Pathogen kann sowohl einen sexuellen wie auch einen asexuellen Lebenszyklus durchlaufen.

Der sexuelle Lebenszyklus des Echten Mehltaus wird in sehr warmen und trockenen Spätsommern initiiert. Durch die Verschmelzung der Ascogonien und Antheridien entstehen Kleistothezien, welche zuerst als gelbe und durch ihre Reifung später als schwarze Punkte auf der Oberfläche der grünen Rebteile erkennbar sind (Mohr, 2005). Die Kleistothezien überwintern durch ihr hakenförmiges Anhängsel an der Borke der Rebe. Im nächsten Frühjahr werden dann die Ascosporen bei Regen aus den Kleistothezien geschleudert und keimen aus. Der sexuelle Zyklus des Echten Mehltaus kommt in unseren europäischen Breitengraden seltener vor als in anderen südlichen Weinbauländern. Daher hat die Überwinterungsform des Pilzes als Myzel beispielsweise in Knospen, in Europa eine größere Bedeutung.

Der asexuelle Zyklus beginnt durch Keimung der Konidien bei Temperaturen zwischen 4-35 °C und einer relativen Luftfeuchte von ca. 100 %. Die Konidien selbst sind allerdings wasserempfindlich und bei direktem Kontakt mit Wasser würden sie aufplatzen (Blaich et al. 1989). Nach der Auskeimung bilden die Konidien einen Keimschlauch mit einem primären Appressorium. Mit Hilfe der Penetrationshyphye durchdringt er die Kutikula bzw. die Epidermis um den Intrazellularraum zu penetrieren. Um die Nährstoffversorgung für den Pilz aufrechtzuerhalten, werden im weiteren Verlauf Haustorien in den Epidermiszellen gebildet (Gadoury et al., 2012). Nach erfolgter Kolonisation bilden schließlich die primären und sekundären Hyphen aus, bis der Pilz reproduktive Strukturen in Form der Konidiophoren und der sich abschnürenden Konidien ausbildet. Hierdurch bildet sich ein Geflecht aus oberflächenüberziehendem Myzel mit Konidiophoren, welches als typisch grauer, ascheartiger

Blattbelag erkennbar ist. Die Konidien werden durch Wind oder Regen auf neue grüne Rebteile transportiert, und der asexuelle Zyklus wiederholt sich, wodurch es zu einer epidemieartigen Ausbreitung des Pilzes kommt.

Die sexuelle Phase spielt bei beiden Pathogenen eine wichtige Rolle, da während der Meiose Sporen mit neuer genetischer Ausstattung entstehen können. Dadurch ist es den Pathogenen möglich Resistenzmechanismen der Pflanzen durch Ausschalten oder Umgehen unwirksam zu machen.

## **2.4 Resistenzzüchtung**

*Vitis vinifera* ist auf Grund ihres hohen Potentials zur Erzeugung von qualitativ hochwertigen Weinen die am meisten kultivierte Weinrebe. Jedoch ist sie hoch anfällig für eine ganze Reihe an Krankheiten, was den übermäßigen Einsatz von Pestiziden, vor allem Fungiziden, zur Folge hat. Die einzige sich bietende Alternative dazu, ist die Entwicklung natürlich resistenter Rebsorten mit hoch qualitativen Beeren durch Züchtung. Um dieses Ziel zu erreichen bedarf es der Introgression von Resistenzmerkmalen wie Quantitative Trait Loci (QTLs) (Paterson et al., 1988) oder idealerweise einzelner Resistenzgene aus Wildarten mit schlechter Beerenqualität in *V. vinifera* um qualitativ hochwertige resistente Rebsorten zu erhalten.

Bei der klassischen Kreuzungszüchtung werden die genetischen Ursachen individueller Merkmale und Charaktereigenschaften auf der Grundlage empirischer Auswertungen kombiniert. Jedoch ist diese Methode äußerst zeitaufwendig und kostspielig und die Entwicklung einer einzelnen neuen Rebsorte wie 'Regent' kann 25-30 Jahre dauern (Eibach und Töpfer, 2003). Molekulare Untersuchungen können hier allerdings Abhilfe schaffen und die Züchtung durch Markerunterstützung beschleunigen. Die genetische Kartierung molekularer Marker, die Kennzeichnung der entsprechenden DNA Abschnitte sowie Untersuchungen zur Übertragung und Verteilung in Keimplasma-Kollektionen sind wichtige Hilfsmittel für die frühe Vererbungsdiagnose und erfolgreiche Züchtungsprogramme (Akkurt et al., 2007). Die Transgressionszüchtung hat zusätzlich zum Ziel, möglichst viele Gene, die ein quantitatives Merkmal in gleichsinniger Weise beeinflussen, zu pyramidisieren.

### **2.4.1 Klassische Kreuzungszüchtung**

Die Resistenzzüchtung gegen Mehltaupathogene bei Weinreben in Europa begann bereits Ende des 19. Jahrhunderts. Da keinerlei Resistenzgrundlagen gegen die beiden Mehltaukrankheiten in den europäischen Weinreben vorhanden waren, wurden äußerst resistente Wildreben aus Nordamerika nach Europa eingeführt. Die amerikanischen Wildreben wurden anschließend mit verschiedensten europäischen Weinreben gekreuzt um die Resistenzeigenschaften der amerikanischen Reben mit den

Qualitätseigenschaften europäischer Reben zu kombinieren. Natürlich hatte diese Strategie einige Limitierungen, da auf Grund der schlechten Weinqualität der amerikanischen Wildreben die Neuzüchtungen der ersten Generation von Hybriden nicht für den Ausbau von hochwertigem Wein geeignet waren. Um dieses Problem zu lösen, mussten über mehrere Generationen hinweg die resistenten Hybriden mit europäischen Reben rückgekreuzt werden. Allerdings musste jede Generation neuer Hybriden zunächst auf ihr Resistenzpotential, das Potential für die Weinqualität und andere landwirtschaftlich wichtige Eigenschaften hin untersucht werden, bevor sie erneut für die Kreuzung eingesetzt werden konnten. Da aber die Entwicklung der Weinreben von den Jahreszeiten gesteuert wird, ist diese Vorgehensweise äußerst langwierig und bedarf sehr großer Anbauflächen. Daher wurde ein Großteil der Resistenzzüchtungsprogramme Anfang des 20. Jahrhunderts wieder gestoppt. Alternativ wurden chemische Spritzmittel entwickelt, um die europäischen Weinreben gegen die Mehltapathogene zu schützen. Trotzdem wurden an einigen Instituten wie dem Institut für Rebenzüchtung, Geilweilerhof weiterhin neue Rebsorten gezüchtet. Auf Grund der langen Bemühungen ist es schließlich gelungen einige resistente Rebsorten auf den Markt zu bringen. Die bislang erfolgreichste Neuzüchtung stellt die resistente Rebsorte 'Regent' dar (Alleweldt und Possingham, 1987).

Ein wichtiger Punkt der bei der Resistenzzüchtung berücksichtigt werden muss, ist die Dauerhaftigkeit der Resistenzeigenschaften die in neue Rebsorten eingezüchtet wurden. In den meisten Fällen wurde ein einzelnes dominantes Resistenzgen in europäische Rebsorten eingekreuzt. Durch Coevolution ist es aber bereits einigen Isolaten des Pathogens gelungen Resistenzgene zu überwinden (Iacono et al., 2013). Ein Ansatz um dem entgegenzuwirken und die Langlebigkeit der Resistenz zu steigern, ist die Kombination von mehreren verschiedenen Resistenzgenen in eine einzelne neue Rebsorte. Diese sogenannte Pyramidisierung sollte es Pathogenen deutlich erschweren die Resistenzen zu überwinden. Zusätzlich wird der präventive unterstützende Einsatz von geringen Mengen an Fungiziden auf den Weinbergen empfohlen. Langanhaltende Resistenz ist vor allem bei mehrjährigen Kulturpflanzen wie der Weinrebe notwendig, da die Pflanzen etwa 30 Jahre lang Ertrag bringen sollen. Die Identifikation verschiedener Resistenzquellen ist daher ein essentieller Schritt für die erfolgreiche Züchtung neuer Rebsorten mit beständiger Resistenz. Die Resistenzzüchtung gegen biotischen und abiotischen Stress wird zusätzlich dadurch motiviert, dass sich das Klima auf der Welt immer weiter verändert, neue Gesetze den Einsatz von Phytochemikalien immer weiter begrenzen und die Fortschritte auf dem Gebiet der Genetik und Genomik der Weinrebe die Züchtung immer weiter vereinfachen.

## 2.4.2 Markergestützte Züchtung

Die klassische Züchtung kann mit Hilfe von molekularen Markertechniken beschleunigt werden. Diese molekularen Techniken erlauben eine bessere Charakterisierung des Zuchtmaterials, eine gezielte Auswahl der Kreuzungspartner und die markergestützte Selektion (MAS) der Nachkommenschaft. Die MAS bringt für die Resistenzzüchtung drei wesentliche Vorteile. Zuerst erlaubt sie die Auswahl von resistenten Genotypen ohne den Aufwand der Infektion und Bonitur sowie Selektion der Pflanzen. Außerdem können resistente Genotypen bereits im Jungpflanzenstadium selektiert werden, was zu einer deutlichen Zeitersparnis führt. Darüber hinaus erlaubt sie die Verfolgung der Introgression verschiedener Resistenzgene in eine einzelne Rebsorte (Pyramidisierung) (Akkurt et al., 2006). Da viele Resistenzgene einen dominanten Effekt auf den Phänotyp der Pflanzen im Bezug auf die Resistenz haben, ist der Nachweis der Introgression von weiteren zusätzlichen Resistenzgenen über eine Phänotypisierung nicht mehr möglich. Daher ist die Verwendung verschiedener molekularer Marker für die verschiedenen Resistenzgene sehr von Vorteil und erlaubt zusätzlich die Selektion von homozygoten Pflanzen. Bei der Verwendung von Kreuzungspartnern die homozygot für die Resistenzgene sind, ist folglich die gesamte Nachkommenschaft resistent, wodurch eine größere Anzahl an neuen Kreuzungspartnern für die weitere Züchtung bereitgestellt wird. Durch die höhere Anzahl an resistenten Kandidaten kann nun zusätzlich auch auf andere Merkmale wie die Weinqualität selektioniert werden. Die MAS macht die Resistenzzüchtung in der Weinrebe effizienter und kann die Zeit für die Züchtung einer neuen marktreifen Resistenzhybride halbieren (Welter et al., 2008). Bevor jedoch molekulare Marker verwendet werden können, muss ihre Relevanz für die Ausprägung einer Resistenz gesichert werden.

## 2.5 Resistenzmechanismen

Pflanzen sind auf Grund ihrer sessilen Lebensweise unterschiedlichen abiotischen und biotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Neben dem Schutz vor lebensfeindlichen klimatischen Einflüssen, wie UV-Strahlung, Trocken- oder Temperaturstress, müssen sich Pflanzen ebenso vor einer Vielzahl phytopathogener Organismen, wie Pilzen, Bakterien und Viren schützen. Pflanzen haben in ihrer natürlichen Umgebung gegenüber Pathogenen, für die sie nicht als Wirt fungieren, eine Basisresistenz bzw. angeborene Immunität (Ebel und Scheel, 1992; Dangl und Jones, 2001), die durch eine Kombination aus präformierten, als Infektionsbarrieren wirkenden Eigenschaften und induzierbaren Abwehrreaktionen geprägt ist. Im Normalfall führt dies nicht zum Zelltod oder zu hypersensitiven Reaktionen (HR) (Grant und Mansfield, 1999).

Wenn es Pathogenen gelingt die pflanzlichen Abwehrmechanismen zu überwinden oder zu unterdrücken so spricht man von einer Basiskompatibilität (Shiraishi et al., 1994) und die Pflanze wird

zunächst zum Wirtsorganismus. Sobald dies passiert, kommt das pflanzliche Immunsystem zum Einsatz, das sich im Wesentlichen in zwei Abwehrsysteme unterteilen lässt. Die Basalabwehr beruht dabei auf der Erkennung allgemeiner essentieller Strukturen von Pathogenen und bewirkt eine Resistenz gegen ein breites Spektrum an Pathogenen in der gesamten Pflanze. Kann das Pathogen nicht erkannt werden oder schafft es die Basalabwehr zu unterdrücken, haben Pflanzen das Prinzip der induzierten Resistenz entwickelt. Hierbei findet eine spezifische Erkennung des Pathogens durch Resistenzgene am Infektionsort statt und löst in Folge dessen eine lokale Abwehrreaktion gegen das erkannte Pathogen aus (Nürnberger et al., 2004). Es ist davon auszugehen, dass beide Abwehrsysteme in ihrer Integrität im pflanzlichen Immunsystem nicht von einander zu trennen sind, da sie sich wahrscheinlich gegenseitig beeinflussen oder gar begünstigen.

### 2.5.1 Passive Abwehr

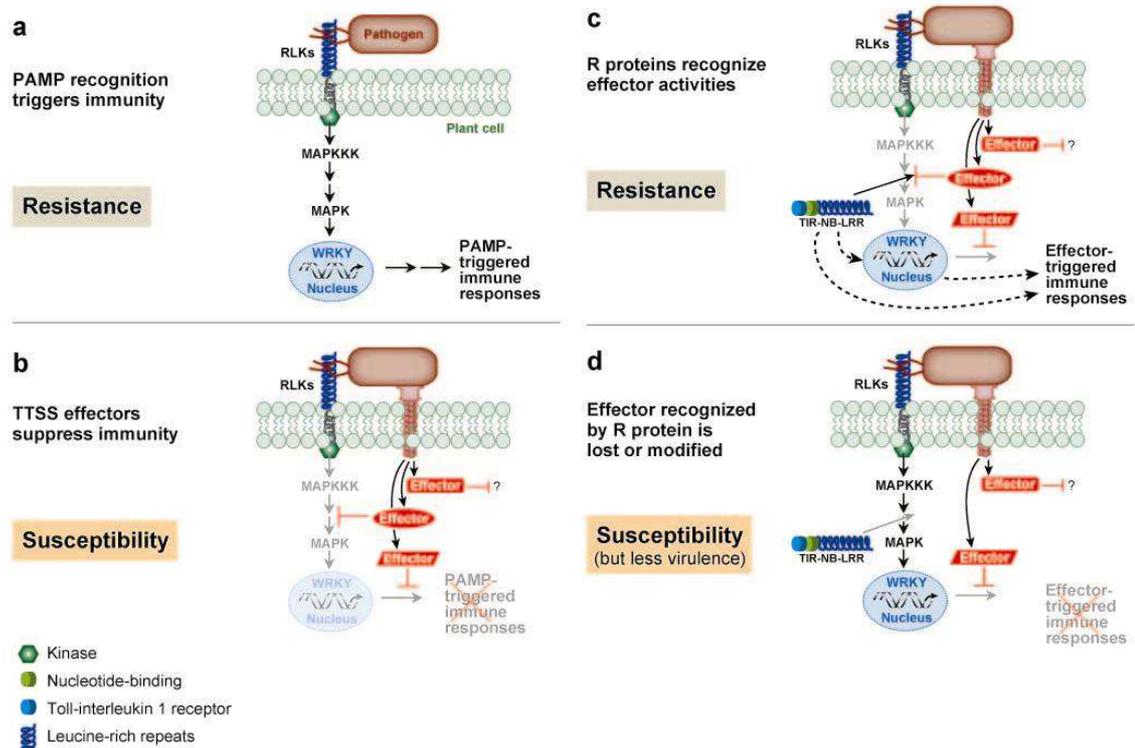
Durch das Zusammenspiel verschiedener Abwehrmechanismen stellt die Besiedlung einer Pflanze durch ein Pathogen in ihrer natürlichen Umgebung eher die Ausnahme dar. Dies liegt oftmals an den zu den passiven Abwehrmechanismen gehörenden strukturellen und chemischen Barrieren in der pflanzlichen Zellperipherie (Kombrink und Somssich, 1995). Eigenschaften wie eine dicke Kutikula oder die Behaarung von Blättern bieten bestimmten Rebsorten morphologischen Schutz vor Pilzbefall (Kortekamp et al., 1999), da die Pilzhyphen nicht in die Pflanzenzellen eindringen können. Durch den Lotuseffekt (Neinhuis et al., 2001) finden Pilzsporen auf hydrophob imprägnierten Pflanzenoberflächen kaum Halt. Auch die Auflagerung von Wachsen ist bei den Beeren verschiedener Rebsorten stärker oder schwächer ausgeprägt und kann durchaus wirksamen Schutz vor Pathogenen bieten.

Die Lignifizierung der Zellwand als Reaktion auf mechanische Reize und Verwundung oder die Einlagerung von Cutin in die Kutikula als strukturelle Modifikationen sowie chemische Modifikationen wie die Einlagerung antimikrobiell wirksamer Substanzen (Phenole) in die Zellwand, bilden die induzierten morphologischen Barrieren (Osborn, 1996). Darüber hinaus stellt die Akkumulation von präformierten antibiotischen Substanzen, wie zyanogenen Glykosiden eine weitere Form der passiven Abwehr dar. Zusätzliche Abwehrmechanismen stellen die lokale Callosedeposition zwischen Zellwand und Plasmalemma an infizierten Spaltöffnungen (Kortekamp et al., 1997), die Papillenbildung am Infektionsort (Pratt, 1984) sowie die Vernetzung der Zellwand durch Laccasen, Peroxidasen und  $H_2O_2$  die auf den „Oxidative Burst“ folgen (Otte und Barz, 2000) dar. Auch wenn eine Korrelation der passiven Abwehrmechanismen zur Resistenz besteht, reichen diese in den meisten Fällen nicht aus um die Resistenz gegen eingeschleppte Pathogene dauerhaft sicherzustellen (Kortekamp et al., 2003).

## 2.5.2 Basalresistenz

Pflanzen sind in der Lage ein breites Spektrum an Strukturen und Mustern zu erkennen, die charakteristisch für alle Klassen von Mikroorganismen sind. Diese Strukturen werden als Elizitoren (Boller et al., 1995) oder „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) bezeichnet. Die erfolgreiche Abwehr, durch Erkennung von PAMPs und Induktion von Signaltransduktionskaskaden wird daher als Basalresistenz oder „PAMP triggered immunity“ (PTI) bezeichnet (Nürnberger et al., 2004) (**Abbildung 2.3a**). Die Erkennung von PAMPs spielt bei der Nichtwirtsresistenz eine große Rolle, da hier ein breites Spektrum von Elizitoren verschiedenster Pathogene erkannt werden muss. Kommt es dennoch zu einer Wirtsinteraktion konnten die eindringenden Pathogene erfolgreich die Erkennung umgehen oder gezielt unterdrücken (Chang et al., 2004). Die Basalresistenz spielt auch nach einer Infektion immer noch eine wichtige Rolle, da sie die Ausbreitung der Krankheit begrenzen kann (Eulgem, 2005).

Für die Erkennung der hochkonservierten PAMPs sind Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs), welche transmembranständig mit der Plasmamembran assoziiert sind verantwortlich (Chisholm et al., 2006) (**Abbildung 2.3a**). Diese PAMPs sind in den meisten Fällen für das Pathogen essentiell. Typische PAMPs sind z.B. bakterielle, methylierte DNA, diverse Zelloberflächenstrukturen wie Lipopolysaccharide von gram-negativen Bakterien, Peptidoglykane von gram-positiven Bakterien, eubakterielles Flagellin und pilzliche Zellwandbestandteile wie Chitine, Glukane, Mannane und Proteine (Nürnberger und Lipka, 2005). Hierbei spielt es keine Rolle ob die PAMPs von den Pathogenen selbst stammen oder durch mikrobielle Aktivität der Pathogene aus pflanzlichem Material (z.B. Zellwanddegradationsprodukte) freigesetzt werden (Gomez-Gomez und Boller, 2000).



**Abbildung 2.3: Modell der Evolution der Resistenz gegen Bakterien in Pflanzen** (Bent et al., 2007).

- (a) Erkennung von PAMPs durch extrazelluläre Rezeptoren aktiviert die Basalresistenz (PTI).
  - (b) Unterdrückung des Basalresistenz durch Injektion von Effektoren mittels des Typ III Sekretionssystems.
  - (c) Erkennung von Effektoren durch Resistenzproteine (TIR-NBS-LRR) aktiviert die induzierte Resistenz (ETI).
  - (d) Versuch der Pathogene durch Variation der Effektoren die Erkennung der Effektoren zu vermeiden.
- Ähnliche Modelle können auch für andere Pflanzenpathogene wie Pilze oder Oomyceten gezeichnet werden.

### 2.5.3 Induzierte Resistenz

Nachdem die Basalresistenz durch Pathogene überwunden wurde (**Abbildung 2.3b**), gibt es zwei mögliche Formen der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen, welche sich im Laufe der Coevolution entwickelt haben. Man spricht von der kompatiblen Interaktion wenn die Pflanze anfällig gegen das Pathogen ist und von der inkompatiblen Interaktion wenn die Pflanze eine zusätzliche Resistenz gegen das Pathogen induzieren kann (Xiao, 2006). Diese induzierte Resistenz wird meistens über Resistenzproteine (R-Proteine) vermittelt, die speziell für ein bestimmtes Pathogen entwickelt worden sind. Die vom Pathogen injizierten Effektoren / Avirulenzfaktoren (Avr-Genprodukte), die in der Lage sind die Basalresistenz zu unterdrücken, werden spezifisch von R-Genprodukten erkannt, was zur Aktivierung physiologischer Abwehrreaktionen in der Pflanze führt (Bent et al., 2007) (**Abbildung 2.3c**). Aus diesem Grund wird die induzierte Resistenz auch als „Effector triggered immunity“ (ETI) bezeichnet. Dieser Resistenzmechanismus wird durch die „Gen-für-Gen“ Hypothese beschrieben (Flor, 1971) und beruht auf dem Vorhandensein komplementärer Paare von bestimmten

Avr-Genen im Pathogen und R-Genen in der Pflanze. Das Fehlen oder eine Mutation im R-Gen sowie Mutationen im Avr-Gen (**Abbildung 2.3d**) können somit nicht zu einer erfolgreichen Abwehr führen (Dangl and Jones 2001). Es findet eine ständige Coevolution zwischen Pathogen und Pflanze statt, welche durch das „Zig-zag-zig“ Modell beschrieben wird (Hein et al., 2009).

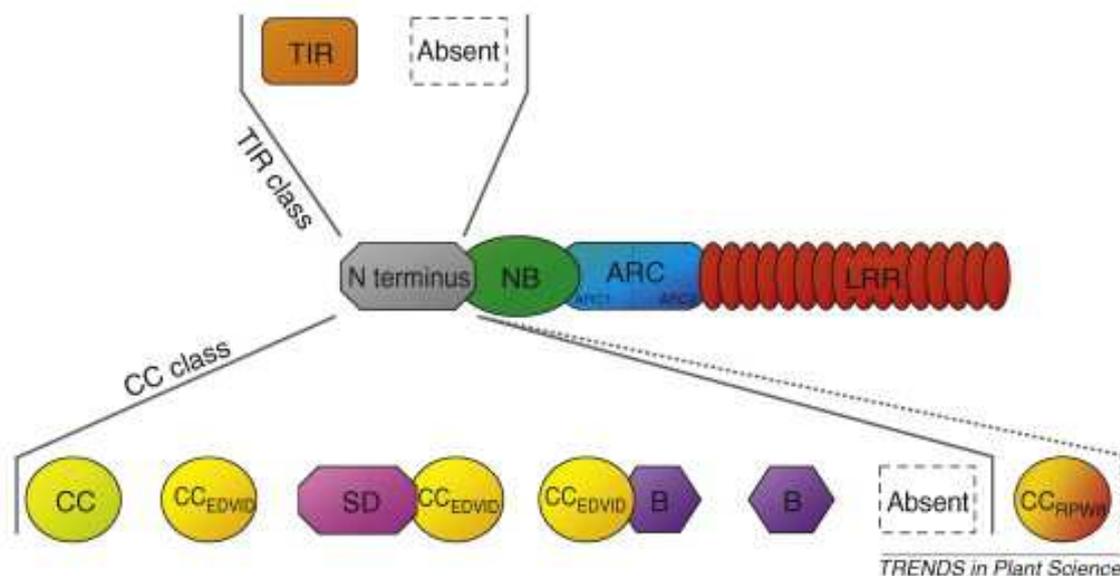
Die „Gen-für-Gen“ Hypothese wird durch das Ligand-Rezeptor Model unterstützt (Keen et al., 1990), bei welcher Avr-Proteine als Ligand und die R-Proteine als Rezeptoren direkt miteinander interagieren. Da bei den meisten Abwehrreaktionen keine direkte Interaktion der R- und Avr-Proteine nachgewiesen werden konnte, wurde die Hypothese durch das „Guardee“ Modell ergänzt (Dangl und Jones, 2001). Dies besagt, dass die R-Proteine ein Wirtsprotein überwachen, welches durch die Effektoren modifiziert wird. Diese Modifizierung kann dann anstelle des Effektors selbst erkannt werden, um die Abwehrreaktion auszulösen (Dangl und Jones, 2001).

Die Effektoren werden größtenteils innerhalb der Zelle, im Zytoplasma und im Zellkern von speziellen Rezeptoren erkannt (Jones und Dangl, 2006). Charakteristisch für diese Rezeptoren ist eine NB-LRR Struktur (**Abbildung 2.4**), benannt nach ihrer NB (Nucleotide Binding) und ihrer LRR (Leucine-Rich-Repeat) Domäne.

## 2.6 Struktur von NB-LRR Resistenzgenen

In Pflanzen können die NB-LRRs aufgrund struktureller Variationen im N-terminalen Bereich in die zwei Hauptklassen der TIR-NB-LRRs (Toll/interleukin-1 receptor) und CC-NB-LRRs (coiled-coil) unterteilt werden (Dangl und Jones, 2001). Die meisten Mitglieder der ersten Klasse besitzen eine Domäne welche homolog zu Toll and interleukin-1 Rezeptoren (TIR) ist und werden daher als TIR-NBS-LRR Proteine bezeichnet (**Abbildung 2.4**). Die zweite Klasse zeigt eine größere Variabilität im N-terminalen Bereich der DNA. Da aber für viele Mitglieder der zweiten Klasse die Formierung einer Doppelwendelstruktur (Coiled Coil - CC) vorhergesagt wird, werden die Proteine dieser Gruppe gerne unter der Bezeichnung der CC-NBS-LRR Proteine zusammengefasst (**Abbildung 2.4**). Die Untergruppe der CC-NBS-LRR Proteine verfügt über eine CC Domäne im N-terminalen Bereich gefolgt von einer NBS und einer LRR Domäne im C-terminalen Bereich, von der man glaubt, dass sie für die Spezifität der Pathogenerkennung verantwortlich ist (Moffett et al., 2002; Qi et al., 2012). Diese Unterklasse kann wiederum unterschieden werden in die Gruppe welche das kleine EDVID Motiv (Rairdan et al., 2008) aufweist und daher zur Untergruppe CC<sub>EDVID</sub>-NBS-LRR Proteine (**Abbildung 2.4**) gehört (Collier und Moffett, 2009) und die Gruppe mit einer Ähnlichkeit zum RPW8 Gen aus Arabidopsis welche dann zunächst als chimäre CC<sub>RPW8</sub>-NBS-LRR Proteine (**Abbildung 2.4**) bezeichnet wurden (Collier und Moffett, 2009) und mittlerweile CC<sub>R</sub>-NB-LRR Proteine genannt werden (Collier et al., 2011). RPW8 gehört zu den nicht-NBS-LRR Resistenzproteinen aus Arabidopsis welches eine Breitspektrum-Resistenz gegen den Echten Mehltau (*Erysiphe* spp.)

vermittelt (Xiao et al., 2001). Während in den Dikotyledonen TIR- und CC-NB-LRRs vorkommen, sind bisher in den Monokotyledonen nur CC-NB-LRRs bekannt.



**Abbildung 2.4: Typische lineare Architektur von pflanzlichen NB-LRR Proteinen mit bekannten N-terminalen Variationen** (Collier et al., 2009).

NB, nucleotide binding domain; LRR, leucine-rich repeat; ARC, Apaf-1, R proteins, CED-4 domain; TIR, Toll and Interleukin-1 Receptor homology domain; CC, coiled-coil; SD, Solanaceae domain; B, BED DNA binding domain; EDVID, "EDVID" motif; RPW8, Resistance to Powdery Mildew 8 protein homology domain.

Durch die hohe Variabilität in der LRR-Domäne können neue Effektormoleküle relativ schnell erkannt werden. Die Signaltransduktion schafft schließlich eine Verbindung der Signalerkennung und der Abwehrantwort miteinander. Sowohl in der Basalresistenz wie auch in der induzierten Resistenz sind ähnliche Signalkomponenten in die Signalübertragung involviert (Nürnberg, 2004). Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) sind wichtige Schlüsselmoleküle für die Signalübertragung in eukaryotischen Zellen, da sie Modifizierungen innerhalb der Zellen erkennen (Zhang und Klessig, 2001). Diese Modifikationen können in Pflanzen entwicklungs- und/oder stressbedingt (Pathogenstress) sein. Es konnte beispielsweise eine Flagellin-induzierte MAPK in *A. thaliana* identifiziert werden, die die Transkription von Resistenzgenen (PR-Genen) über die WRKY Transkriptionsfaktoren aktiviert (Zhang et al., 2005b). Dies deutet darauf hin, dass sowohl die induzierte Resistenz wie auch die Basalresistenz wahrscheinlich die selben Signaltransduktionswege benutzen.

---

## 2.7 Beteiligung von Transkriptionsfaktorfamilien an der Genregulation in Pflanzen

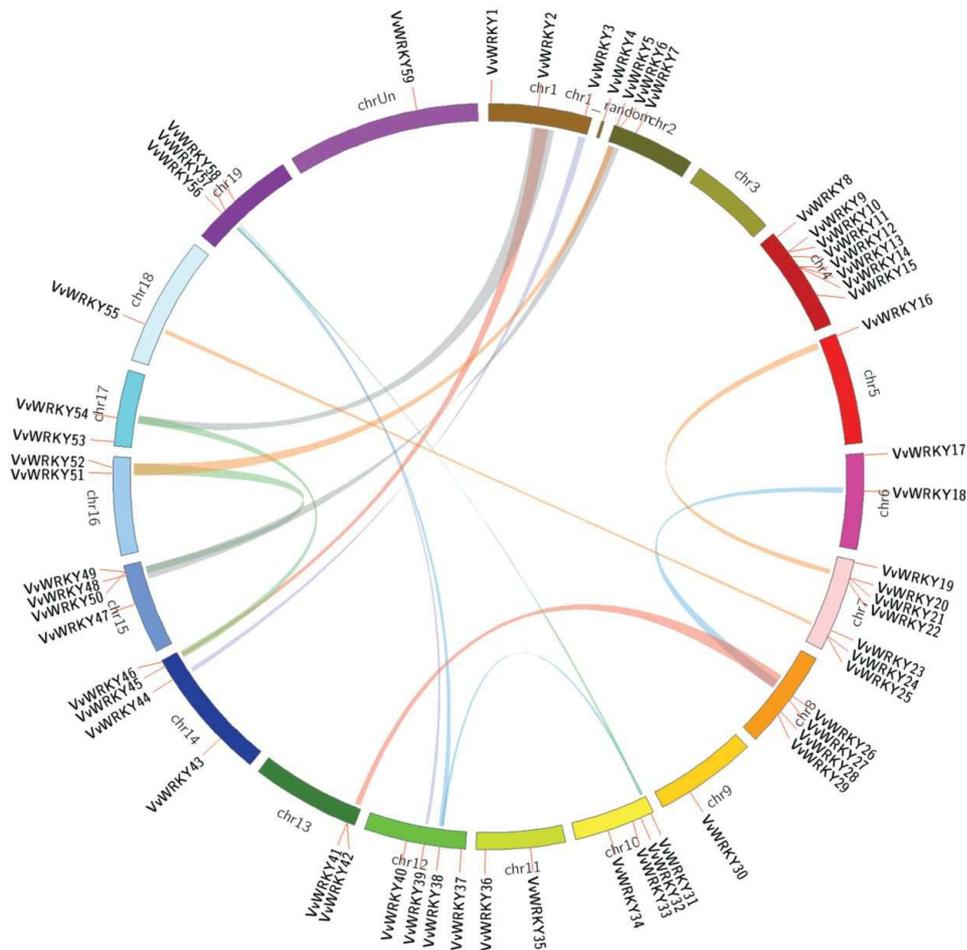
Für die Transkription der DNA innerhalb der Zellen werden verschiedene Proteine und Proteinkomplexe benötigt (Roeder, 1991). Diese lassen sich in verschiedene Transkriptionsfaktor (TF) Klassen einteilen:

(I) Sequenzspezifische DNA-bindende Regulatoren: Diese können an die Promotoren der Gene binden und die Regulation durch Aktivieren oder Reprimieren beeinflussen. (II) Allgemeine Transkriptionsfaktoren: Diese sind überall in der Zelle verbreitet und bilden zusammen mit der RNA-Polymerase II den Pre-Initiierungskomplex (PIC) zur mRNA Synthese. (III) Co-Faktoren / Regulatoren: Diese können wiederum an die Transkriptionsfaktoren der Klassen I und II binden und sind teilweise essentiell an der Regulation beteiligt (Baldwin und Gurley, 1996). Die Transkription von Genen ist abhängig von der Lokalisation innerhalb der Zelle, dem Entwicklungsstadium und endogenen sowie exogenen Faktoren (Singh, 1998). Die Aktivität der TFs kann durch posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung beeinflusst werden (Hunter und Karin, 1992). Neben einer DNA-Bindedomäne weisen TFs meist Aktivierungs- und Reprimierungsdomänen auf. Auf der Grundlage von strukturellen Ähnlichkeiten können TFs in Familien und Subfamilien eingeteilt werden (Singh, 1998). In Arabidopsis kodieren mindestens 6 % aller Gene für TFs, was im Vergleich zu Tieren, Insekten und Pilzen eine überdurchschnittlich hohe Zahl darstellt (Riechmann et al., 2000). Die drei größten TF Familien stellen AP2/ERF, MYB und bHLH (basic Helix-Loop-Helix) dar, wohingegen in Pflanzen ein deutlich geringerer Anteil an CZF1/ZFAR1 TFs vorhanden ist als in Tieren und Pilzen. Einige TF Familien konnten bisher nur in Pflanzen nachgewiesen werden. Hierzu zählen die Familien der EREBP (Ethylene responsive element binding protein), NAC (NAM (no apical meristem); ATAF (Arabidopsis transcription activation factor); CUC (cup-shaped cotyledon)), WRKY und R2R3-MYB TFs. Die größere Ausstattung mit TFs und die hohe Amplifikationrate einzelner Familien, kann als pflanzenspezifisch angesehen werden und stellt wahrscheinlich eine besondere Anpassung an die sessile Lebensweise der Pflanzen und die dadurch entstandene Notwendigkeit auf exogene Einflüsse zu reagieren, dar (Riechmann et al., 2000).

### 2.7.1 WRKY Transkriptionsfaktoren

Hunderte WRKY Faktoren in verschiedensten Pflanzenspezies wurden bislang für ihre Funktion bei abiotischem und biotischem Stress beschrieben (Devaiah et al. 2007). In der Weinrebe konnten bis heute 59 Mitglieder der WRKY Superfamilie identifiziert werden (**Abbildung 2.5**), von denen nur

wenige funktionell charakterisiert werden konnten (Velasco et al. 2007; Zhang et al. 2011; Guo et al., 2014).



**Abbildung 2.5: Verteilung der Wein WRKY Gene auf den Chromosomen** (Guo et al., 2014).

Chromosom 1-19 sind in zirkulärer Form in verschiedenen Farben dargestellt. Die ungefähre Position der *VvWRKY* Gene ist mit einer roten Linie angegeben.

WRKY Faktoren lassen sich an Hand der Anzahl an WRKY (WRKYGQK) Domänen mit einer Länge von etwa 60 Aminosäuren in verschiedene Untergruppen einteilen. Zusätzlich verfügen WRKY Faktoren über Zinkfingerdomänen (C-X4-C-X22-H-X1-H) im C-terminalen Bereich (Eulgem et al., 2000). WRKYs binden an die W-Box (C/TTGACC/T) die man im Promotorbereich von vielen Genen finden kann. Für *VvWRKY1* wurde bereits gezeigt, dass dieser spezifisch an das W-Box Kernmotiv TTGACC binden kann (Marchive et al., 2007). Es konnte ferner gezeigt werden, dass W-Boxen in den Promotorregionen von Arabidopsis Genen, die bei der Pathogenabwehr aktiviert werden, überrepräsentiert sind (Maleck et al., 2010).

Für WRKY Proteine wurde nachgewiesen, dass sie essentielle Komponenten in verschiedenen Signalwegen bei unterschiedlichsten Stressarten sind und *PR* Gene über die Bindung an das W-Box *cis*-Element in den Promotorbereichen, induzieren können (Maleck et al. 2000; Yu et al. 2001). Beispielsweise führte die Überexpression von *VvWRKY1* in Tabak zu einer erhöhten Resistenz gegen verschiedene Pathogene wie den Falschen und Echten Mehltau, was eine Beteiligung in der Abwehrreaktion vermuten ließ (Marchive et al., 2007). Stabil transformierte *in vitro* Reben zeigten eine gesteigerte Resistenz gegen *P. viticola* durch transkriptionelle Reprogrammierung (Marchive et al., 2013). Für *VvWRKY2* wurde eine Funktion in der Resistenz gegen *B. cinerea* in Tabak gezeigt, was vermutlich auf die Induktion von *VvPR2* zurückzuführen war (Mzid et al., 2007; Guillaumie et al., 2010). Es konnte nachgewiesen werden, dass *VvWRKY11* durch Infektion mit *P. viticola* induziert wird und die W-Box innerhalb des Promotors bindet und die ektopische Expression führte zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Salzstress in Arabidopsis Sämlingen (Liu et al., 2010). Für die TFs *VpWRKY1*, *VpWRKY2* und *VpWRKY3* aus *Vitis pseudoreticulata* konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau in Arabidopsis führte (Li et al., 2010). Das nächste *VvWRKY33* Homolog aus Arabidopsis ist *AtWRKY33*. Für *AtWRKY33* konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass er die Resistenz gegen nekrotrophe Pilze (Zheng et al., 2006), Salzstress (Jiang und Deyholos, 2008) sowie Hitzestress (Li et al., 2011) positiv beeinflussen kann. Außerdem konnte in Petersilie gezeigt werden, dass *WRKY1* an den Promotor des *PR1* Gens bindet und eine Aktivierung bewirkt. Zusätzlich wiesen die Daten darauf hin, dass *WRKY1* als Antwort auf eine Infektion seine eigene Expression induzieren kann (Eulgem et al., 1999).

## 2.7.2 AP2/ERF Transkriptionsfaktoren

In der Weinrebe konnten der AP2/ERF Superfamilie bisher 149 Mitglieder (**Abbildung 2.6**) zugeordnet werden (Licausi et al., 2010). ERF Faktoren zeichnen sich durch eine konservierte AP2/ERF Domäne von 60-70 Aminosäuren aus. Außerhalb dieser konservierten Domäne besteht eine hohe Variabilität zwischen den verschiedenen ERF Faktoren (Riechmann und Meyerowitz, 1998). AP2/ERF Faktoren binden an Ethylene-responsive Elemente (ERE) repräsentiert durch die GCC-Box oder Elicitor-responsive Elemente (JERE) (Sahle und Pagés, 2003). GCC-Box Elemente lassen sich in den Promotorregionen einer Vielzahl von *PR* Genen finden (Vom Endt et al., 2002).

Die Induktion der ERE Elemente durch die Arabidopsis TFs *AtERF1-5* wurde bereits genauer untersucht (Fujimoto et al., 2000) und die Induktion der JERE Elemente durch *CrORCA1-2* wurde in *Catharantus roseus* beschrieben (Menke et al., 1999). Es wurde außerdem gezeigt, dass *Tsi1* (*Tobacco stress-induced gene*) ein ERF Faktor aus *Nicotiana tabacum* nach transientser Transformation in Tabak

die Expression verschiedener *PR* Gene induziert, was zu einer verbesserten Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* führte (Park et al., 2001).

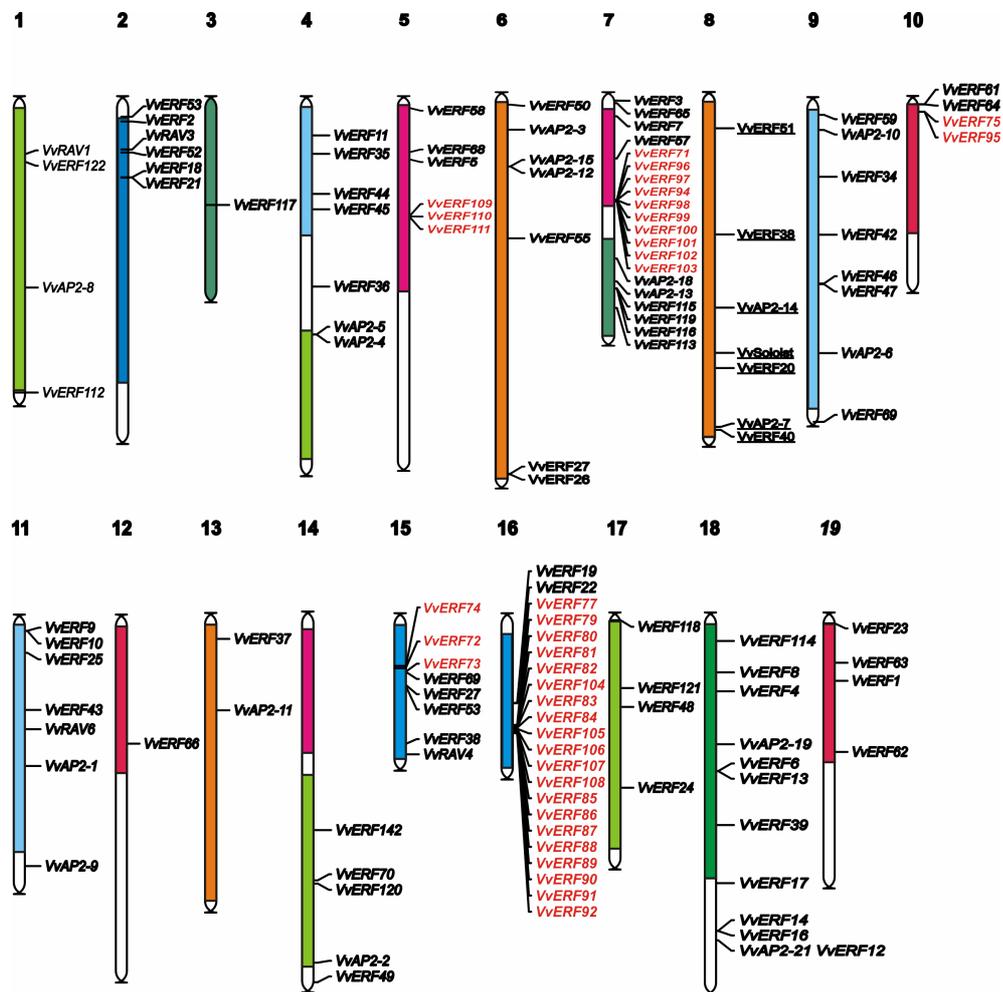


Abbildung 2.6: Lokalisierung der *V. vinifera* AP2/ERF Gene auf den Chromosomen (Licausi et al., 2010).

### 2.7.3 CZF1/ZFAR1 Transkriptionsfaktoren

CZF1/ZFAR1 TFs verfügen über eine Zinkfinger-Domäne sowie Ankyrin Wiederholungsdomänen, welche eine der am weitesten verbreiteten Protein-Protein Interaktionsplattformen in der Natur darstellen (Mosavi et al., 2004). Die genaue Anzahl an CZF Faktoren in der Weinrebe wurde bislang nicht untersucht. Durch die koordinative Bindung eines Zinkions ( $Zn^{2+}$ ) innerhalb der Zinkfinger-Domäne bildet sich eine schleifenförmige 3D-Struktur aus, die als Zinkfinger bezeichnet wird (Abbildung 2.7). Es wurde gezeigt, dass eine Induktion dieser TFs in Arabidopsis durch eine Inokulation mit *Botrytis cinerea* ausgelöst werden kann. Diese Reaktion scheint dabei unabhängig von JA (Jasmonsäure), ET (Ethylen) und SA (Salicylsäure) ausgelöst zu werden. Ein Funktionsverlust dieser TFs führte zu erhöhter Anfälligkeit gegen Infektionen mit *B. cinerea* (AbuQamer et al., 2006).

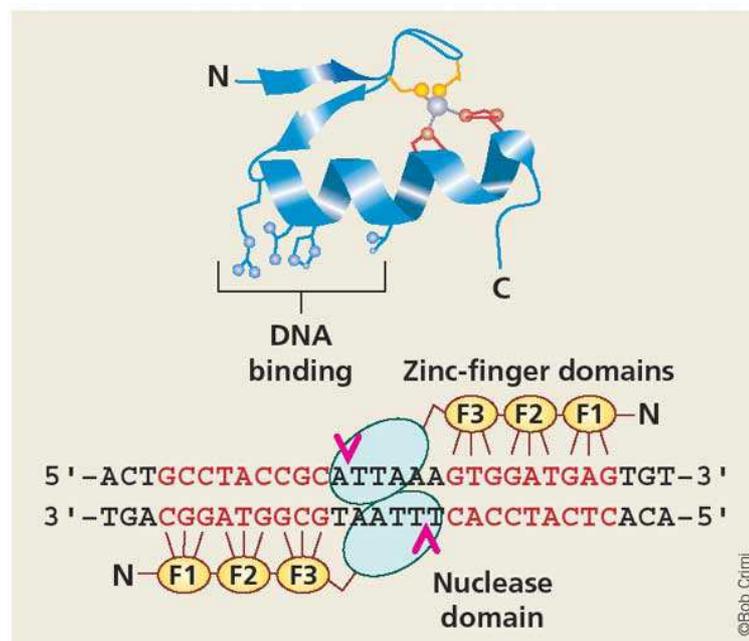


Abbildung 2.7: Der Mittelfinger des Zif268 / EGR-1 (Early growth response protein 1) TFs zur Darstellung der allgemeinen Struktur einer Zinkfingerdomäne und der DNA Bindemotive (Wilson, 2003).

## 2.8 Akkumulation von PR-Genen nach Pathogeninfektion

Neben den oben beschriebenen Abwehrmechanismen kommt es nach Infektion meist zusätzlich zu Veränderungen in der Genaktivität. Eine der wichtigsten Genfamilien umfasst die *PR*-Gene (*pathogenesis-related genes*), die die klassischen PR-Proteine (Resistenzproteine) kodieren. Als PR-Proteine bezeichnet man kleine Polypeptide die in gesunden Pflanzen unter normalen Bedingungen nicht akkumulieren, sondern meist erst nach biotischem oder abiotischem Stress synthetisiert werden. Auf Grund der großen Komplexität lassen sich die PR-Proteine in 14 verschiedene Gruppen einteilen (PR1-PR14) (Kombrink und Somssich, 1995).

Die PR1 Proteine besitzen ein N-terminales Signalpeptid, welches den Transport der Proteine zum Endoplasmatischen Retikulum steuert. Die sauren Formen der PR1 Proteine werden anschließend in den Interzellularraum sekretiert, wohingegen die basischen in der Vakuole akkumulieren. Bislang konnte die Funktion der PR1 Proteine nicht geklärt werden.

Es ist bekannt, dass die *PR2* Gene für *1,3-β-Glucanasen* kodieren, welche *in vitro* antifungale Eigenschaften zeigen. Sie wurden in verschiedenen Pflanzenspezies beschrieben und zeigen eine starke Akkumulation nach Pathogenbefall (Delp und Palva, 1999).

Zu den PR3 Proteine zählen die Chitinasen, die das Wachstum von Pilzen durch Hydrolisierung der Zellwand hemmen (Schlumbaum et al., 1986). Chitinasen konnten nach Pathogenbefall und nach Behandlung mit Phytohormonen nachgewiesen werden (Ponath et al., 2000).

Die Gruppe der PR4 Proteine ist weniger gut untersucht, weshalb die genauen Funktionen nicht bekannt sind.

Bei den PR5 Proteinen hingegen ist bekannt, dass hierzu die Thaumatin-ähnlichen Proteinen bzw. die Osmotine zählen. Proteine der Gruppe PR5 wurden bisher in verschiedenen Pflanzenspezies nach Pathogeninfektion, Hormonbehandlung, Salz- und Trockenstress sowie nach Verwundung nachgewiesen (Hu und Reddy, 1997).

Die Gruppe der PR6 Proteine umfasst Protease-Inhibitoren und zählt nicht zu den klassischen PR Proteinen, da sie entwicklungsabhängig und nach Insektenbefall akkumulieren. Eine konstitutive Expression von Proteinase-Inhibitoren in verschiedenen Pflanzen führt zu einem Absterben von pflanzenschädigenden Insekten (Tamayo et al., 2000).

Die genaue Funktion der Gruppen PR7-PR9 ist ebenfalls nicht bekannt. Zu den PR7 Proteinen zählen pathogeninduzierte Proteinasen. PR8 Proteine umfassen weitere Chitinasen. Die Peroxidasen verschiedener Spezies gehören zur Gruppe PR9 und lassen sich ebenfalls durch Pathogene induzieren.

Als intrazelluläre Proteine (IPR) werden die Proteine der Gruppe PR10 bezeichnet, die sowohl nach Pathogenbefall, als auch unter abiotischem Stress und sogar entwicklungsabhängig akkumulieren (Robert et al., 2001). Die Überexpression von *Vitis pseudoreticulata* VpPR10.2, dem direkten Homolog von VvPR10.2, in der anfälligen Rebsorte 'Carignane' konnte die Resistenz gegen *P. viticola* steigern. Außerdem konnte für das rekombinante VpPR10.2 Protein eine DNase Aktivität gegen genomische Wirts-DNA und eine RNase Aktivität gegen Hefe-RNA *in vitro* gezeigt werden (He et al., 2012)

Zur Gruppe PR11 zählen Chitinasen der Klasse V aus Tabak. Hierbei handelt es sich um antimikrobielle Peptide, die sowohl als präformierte Komponenten vorhanden sind, als auch nach Pathogenbefall induziert werden und Teil der pflanzlichen Abwehr sind.

Weitere antimikrobielle Peptide stellen die Defensine in der Gruppe PR12, die Thionine der PR13 Gruppe sowie Lipid-Transfer-Proteine der Gruppe PR14, welche durch Änderung der Membranpermeabilität antibakteriell und antifungal wirken können (García-Olmedo et al., 1998) dar.

### **3 Ziele der Arbeit**

Da die Weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*) hoch anfällig für eine Vielzahl verschiedener Pathogene wie beispielsweise den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) ist, müssen hohen Mengen an Fungiziden eingesetzt werden, um hohen Ernteaussfällen im Weinbau vorzubeugen. Um die Belastung von Mensch und Umwelt durch die Phytochemikalien in Zukunft zu senken, kann die Züchtung neuer resistenter Rebsorten eine Option darstellen. Die steigende Nachfrage nach resistenten Rebsorten mit ausgeprägter Resistenz gegen eine Vielzahl verschiedener Pathogene wie den Falschen Mehltau und den Echten Mehltau (*Erysiphe necator*), beschäftigt heute viele Züchter. Die meisten Forschungsprojekte zielen auf die Kartierung und Pyramidisierung (Kombination verschiedener Resistenzregionen in einem Genotyp) von Regionen eines quantitativen Merkmals (QTL - quantitative trait loci), welche über genomweite Assoziationsstudien ermittelt wurden. Die eigentliche Ursache für die Resistenz, also die Resistenzgene selbst, bleiben hierbei weitestgehend unerforscht.

Da die genauen Resistenzursachen in der Weinrebe größtenteils unbekannt sind, ist die Identifikation und Aufklärung der Regulation der beteiligten Gene zur Abwehr von Pathogenen in Weinreben zur Verbesserung und Beschleunigung der Züchtung notwendig. Das Erforschen von Resistenzmechanismen in Weinreben zur Verbesserung der Züchtung neuer resistenter Sorten ist daher ein aktuelles Thema. Es wurde bereits in verschiedenen Spezies gezeigt, dass Transkriptionsfaktoren (TFs) wie z.B. WRKY, ERF oder MYB Faktoren entscheidend an der Signaltransduktion zur Abwehr gegen verschiedenste biotische und abiotische Stressarten beteiligt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zur Aufklärung der Resistenzmechanismen die Untersuchung der Signaltransduktionskaskaden in der Weinrebe während der Abwehr der Infektion durch *P. viticola* (Falscher Mehltau) untersucht. Zur Aufklärung der Mechanismen für die Erkennung des Pathogens (I) und die Induktion der Resistenzantwort (II) wurde das Projekt in zwei Schwerpunkte untergliedert:

- (I) Charakterisierung einer möglichen Pathogenrezeptorfamilie in der Weinrebe und die Bedeutung der Rezeptoren für die Resistenz gegen *P. viticola*.
- (II) Transkriptionelle Regulation eines Resistenzgens aus der Weinrebe durch Transkriptionsfaktoren (TFs) und der Einfluss der TFs auf die Resistenz gegen *P. viticola*.

## 4 Ergebnisse

Zur Aufklärung der Signaltransduktion in der Weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*) während der Abwehr der Infektion durch *Plasmopara viticola* (Falscher Mehltau), wurde zum einen die Erkennung und Perzeption des Pathogens über Rezeptoren sowie zum anderen die transkriptionelle Regulation mittels Transkriptionsfaktoren (TF) analysiert.

Dazu wurden im ersten Teil zunächst die Gene der *VRP1* (*Vitis Resistance to Plasmopara*) Rezeptorfamilie charakterisiert, anschließend in Protoplasten lokalisiert und zum funktionellen Nachweis transient in Weinrebenblättern sowie stabil in *Arabidopsis thaliana* transformiert und anschließend infiziert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde zunächst die Induzierbarkeit des Resistenzgens *VvPR10.1* (*Pathogenesis Related 10.1*) durch TFs untersucht. Die transiente Transformation ausgewählter TFs in Weinrebenblättern mit anschließender *P. viticola* Infektion wurde anschließend zum funktionellen Nachweis durchgeführt. Zusätzlich wurde zur Klärung der Funktion von *VvWRKY33* die *A. thaliana* knock-out Mutante *wrky33-1* mit *VvWRKY33* komplementiert.

### 4.1 Charakterisierung der *VRP1* Rezeptoren aus der Weinrebe

In Vorarbeiten wurde nach Infektion der resistenten *Vitis riparia* Selektion 'Gloire de Montpellier' im Vergleich zu der anfälligen Rebsorte 'Riesling' mit *P. viticola* eine differentielle Genexpressionsanalyse durchgeführt. In der Mikroarray Analyse konnte die Rezeptorfamilie *VRP1* als hochreguliert in der resistenten Rebsorte identifiziert werden. Die Strukturaufklärung zeigte die Tandem-artige Anordnung von drei sich ähnelnden Kopien der *Plasmopara*-induzierten *VRP1* Gene, flankiert von retrotransposonalen Elementen. Die drei Gene *VRP1-1*, *VRP1-2* und *VRP1-3* erwiesen sich als CC-NBS-LRR (Coiled Coil - Nucleotide Binding Site - Leucine Rich Repeat) kodierende Gene teilweise, mit zusätzlicher *RPW8* (*Resistance to Powdery Mildew*) Domäne aus *Arabidopsis*, mit Ähnlichkeit zu dem Resistenzgen *NRG1* aus *Nicotiana benthamiana* (40 % Homologie) und *ADRI* (31 % Homologie) aus *A. thaliana* deren Funktion in der Pathogenabwehr bereits beschrieben wurden (Kortekamp et al., 2008).

### 4.1.1 Isolierung und bioinformatische Analyse der *VRP1* Rezeptoren aus einer anfälligen und einer resistenten Rebsorte

Zur Aufklärung der unterschiedlichen Expression der *VRP1* Gene zwischen resistenten und anfälligen Rebsorten wurden die drei Gene *VRP1-1*, *VRP1-2* (mit N-terminaler *RPW8* Domäne) und *VRP1-3* (ohne *RPW8* Domäne) aus cDNA der resistenten Rebsorte 'Regent' und der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' vergleichend kloniert. Die Sequenzierung zeigte, dass für alle Gene jeweils nur eins von zwei möglichen Allelen amplifiziert werden konnte. In der weiteren Analyse zeigte sich kein Unterschied in der Primärstruktur zwischen den entsprechenden Proteinen aus 'Regent' und 'Lemberger'. Die drei *VRP1* Gene zeigten auf cDNA Ebene eine über 80 %-ige Homologie untereinander. Auf gDNA Ebene unterschied sich *VRP1-1* vor allem durch ein verlängertes Intron 1 von den beiden anderen Genen (Abbildung 4.1).

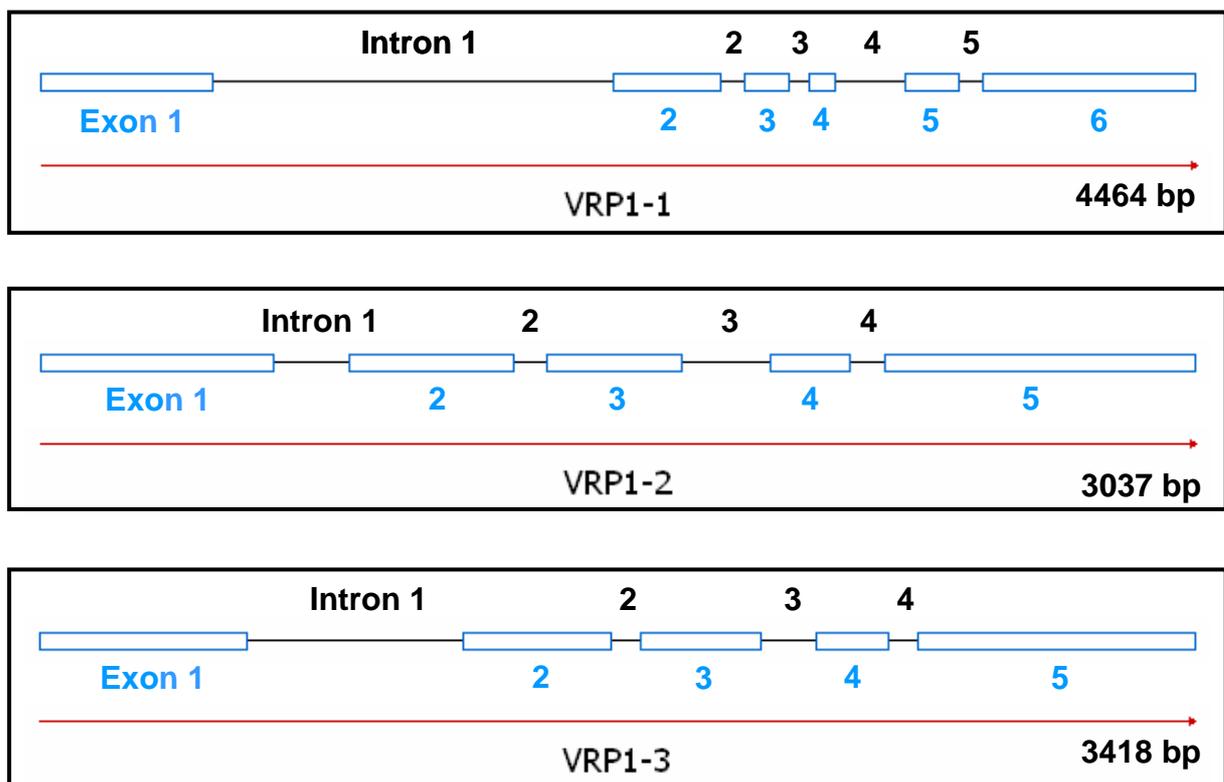
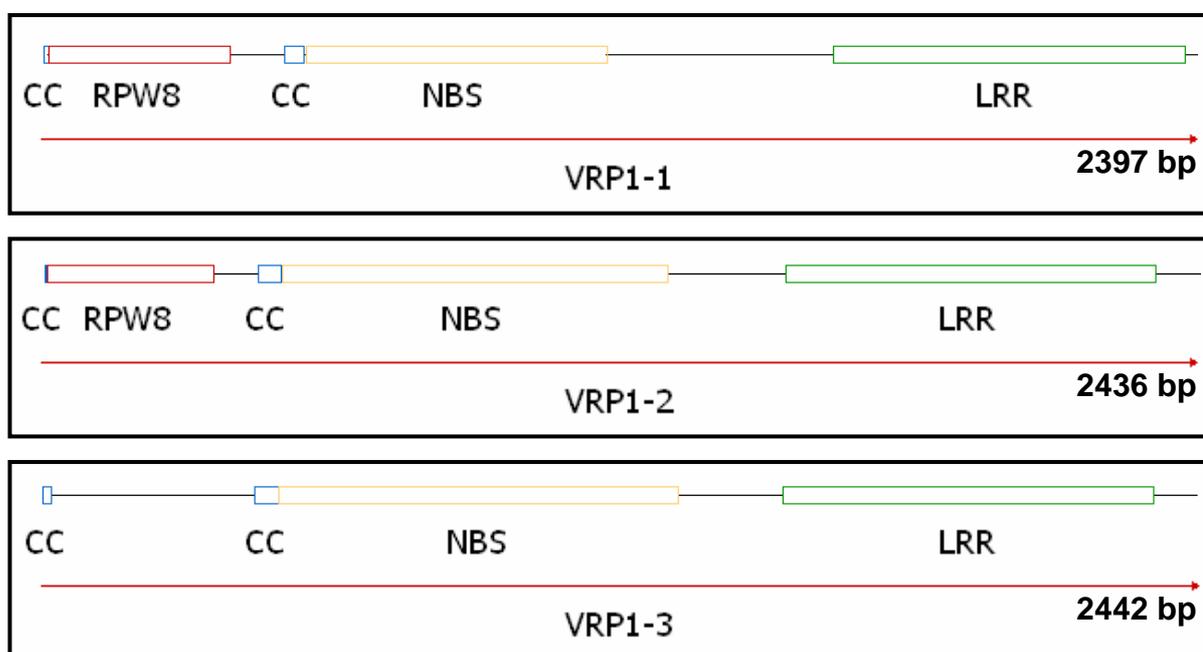


Abbildung 4.1: Exon/Intron Struktur der *VRP1* Genfamilie.

Die Exons der klonierten *VRP1* Rezeptorgene wurden mittels des Clone Manager Version 7 (SciEd Central) graphisch als blaue Rechtecke und die Introns als schwarze Verbindungslinien dargestellt. Die Zahlen stellen die verschiedenen Exons und Introns der einzelnen *VRP1* Gene dar. Die roten Pfeile zeigen die Gesamtlänge der genomischen DNA Sequenzen mit Angaben der Anzahl an Basenpaaren (bp) an.

Die drei Gene *VRP1-1*, *VRP1-2* und *VRP1-3* wurden bereits genetisch kartiert. Sie liegen auf der Kopplungsgruppe 10 und nicht im Haupt-QTL Bereich einer der beiden publizierten *P. viticola* Resistenzen (*Rpv3* und *Rpv10*) (Kortekamp et al., 2008) und sind daher interessante Kandidaten für die Züchtung. Die N-terminalen Bereiche der Gene *VRP1-1* und *VRP1-2* verfügen über große Ähnlichkeit zu den Genen *RPW8.1* und *RPW8.2* (Abbildung 4.2), welche in *A. thaliana* Ms-0 eine breite, unspezifische Resistenz gegen verschiedene Pathogene hervorrufen (Xiao et al., 2001). Die RPW8 Proteine aus Arabidopsis besitzen eine Transmembran (TM) - Domäne und sind wahrscheinlich an das Endomembransystem gebunden. Es wurde ein gezielter Transport zur extrahaustoriellen Membran (EHM) in infizierten Arabidopsis Blättern gezeigt (Wang et al., 2009). Die C-terminalen Bereiche der *VRP1* Gene weisen die klassische Struktur von CC-NBS-LRR Resistenzgenen auf (Abbildung 4.2). Diese Art von Resistenzgenen wurde in anderen Arbeiten überwiegend im Cytoplasma lokalisiert.

*VRP1-1* und *VRP1-2* aus der Weinrebe könnten daher im Gegensatz zu *VRP1-3* und anderen bekannten Resistenzgenen einen neuen Typ chimärer Resistenzproteine darstellen, bei denen eine Fusion aus einer allgemeinen *RPW8*-Domäne und einem spezifischen Resistenzprotein vom Typ CC-NBS-LRR vorliegt.



**Abbildung 4.2: Genstruktur der *VRP1* Rezeptorgene mit Angabe charakteristischer Elemente.**

Die verschiedenen charakteristischen Bereiche wurden mit Hilfe des ExPASy Proteomics Tools (Swiss Institute of Bioinformatics) bestimmt und mittels des Clone Manager Version 7 (SciEd Central) graphisch als farbige Rechtecke dargestellt. Die roten Pfeile zeigen die Gesamtlänge der Offenen Leserahmen (ORF) mit Angaben der Anzahl an Basenpaaren (bp) an. CC, Coiled coil Struktur (Blaue Box); RPW8, Resistance to Powdery Mildew 8 Struktur (Rote Box); NBS, Nucleotide Binding Site Domäne (Gelbe Box); LRR, Leucine Rich Repeat Domäne (Grüne Box).

Zur Klärung der Lokalisation wurden zunächst unter Verwendung verschiedener Algorithmen aus dem Internet (Online Lokalisierungsvorhersageprogramme) sowie der Primär- und Sekundärstruktur der Proteine statistische Wahrscheinlichkeiten für die Lokalisierung in den verschiedenen Kompartimenten berechnet und Signalpeptide ermittelt (**Tabelle 4.1**).

YLOC stellt einen interpretierbaren WEB Server für die Vorhersage der subzellulären Lokalisation dar. Es kann für Pflanzen die fünf verschiedenen Lokalisierungen: Zellkern, Cytoplasma, Mitochondrien, Chloroplasten und den sekretorischen Stoffwechselweg vorhersagen (Briesemeister et al., 2010). Für alle drei VRP1 Proteine wurde eine über 60 %-ige Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation im Cytoplasma vorhergesagt. Die SubLoc Server Suite stellt Vorhersagen der subzellulären Lokalisation auf Grundlage der SOAP (Simple Object Access Protocol) Technologie an. Die Datenbank verfügt über mehr als 60.000 Proteinsequenzen (Chen et al., 2005). Auch hier wurde für alle drei VRP1 Proteine eine Lokalisation im Cytoplasma mit einer Wahrscheinlichkeit von sogar mehr als 80 % vorhergesagt. CELLO hingegen macht Vorhersagen durch support vector machines (SVM) basierend auf n-Peptid Zusammensetzungen (Yu et al., 2004). Hier war die Vorhersage bereits nicht mehr eindeutig. Es wurde sowohl eine Lokalisation im Cytoplasma wie auch im Zellkern für alle drei VRP1 Proteine vorhergesagt. mPloc kann durch drei verschiedene Arten der Pseudo Aminosäurezusammensetzung die Lokalisation in 22 verschiedenen eukaryotischen Kompartimenten vorhersagen (Chou et al., 2010). Hier wurde eine Vorhersage für die VRP1 Proteine im Cytoplasma gemacht, allerdings wurde hier keine Angabe zur Verlässlichkeit der Vorhersage gemacht. slplocal2 nutzt zur Vorhersage der Lokalisierung ebenfalls SVMs. Zusätzlich werden lokale Charakteristika berechnet indem das Protein aufgeteilt wird in den N-terminalen Bereich, den Mittelbereich und den C-terminalen Bereich (Matsuda et al., 2005). Hierdurch ergab sich eine Vorhersage für die Lokalisierung der VRP1 Proteine entweder im Zellkern oder im Cytoplasma erneut ohne Angabe einer Wahrscheinlichkeit. OCTOPUS macht Vorhersagen zur transmembranen Proteintopologie durch die Verwendung von künstlichen neuronalen Netzwerken (ANN) und des hidden Markov Models (HMM) (Viklund und Elofsson, 2008). Hierdurch wurde für VRP1-1 eine Transmembran- (TM) Helix vorhergesagt, die in den beiden anderen Proteinen nicht vorhanden war. TMPred kann ebenfalls benutzt werden um transmembrane Bereiche in Proteinen zu identifizieren. Es benutzt hierfür eine Datenbank von membranüberspannenden Proteinsegmenten (Hofmann und Stoffel, 1993). Mit Hilfe dieser Datenbank wurden für VRP1-1 zwei TM-Helices und für VRP1-2 und VRP1-3 je eine TM-Helix vorhergesagt. Als letztes wurde SignalP 4.0 verwendet welches für die Unterscheidung zwischen Signalpeptiden und Transmembranregionen verwendet werden kann. Die neuste Version 4.0 verwendet hierfür nur noch künstliche neuronale Netzwerke (Petersen et al., 2011). Es wurde lediglich für VRP1-1 ein Signalpeptid im N-terminalen Bereich des Proteins vorhergesagt (**Tabelle 4.1**).

VRP1-1 zeigte insgesamt eine 50-74 %-ige Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation im Cytoplasma. Zusätzlich wurden aber auch eine oder zwei Transmembranhelices und ein Signalpeptid identifiziert. VRP1-2 zeigte mit 45-84 % eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation im Cytoplasma.

Zusätzlich wurde aber auch hier eine Transmembranhelix identifiziert. VRP1-3 zeigte eine 40-84 %-ige Wahrscheinlichkeit auch im Cytoplasma lokalisiert zu sein. Zusätzlich konnte aber auch eine Transmembranhelix identifiziert werden. Obwohl eine hohe Wahrscheinlichkeit für alle drei Proteine für die Lokalisation im Cytoplasma vorhergesagt wurde, konnten dennoch auch TM-Bereiche und Signalpeptide vorhergesagt werden, die auch eine Lokalisation im Endomembransystem nicht ausschließen lassen.

**Tabelle 4.1: Putative subzelluläre Lokalisation von VRP1-1/2/3 ermittelt durch bioinformatische Analysen an Hand der Signalpeptide**

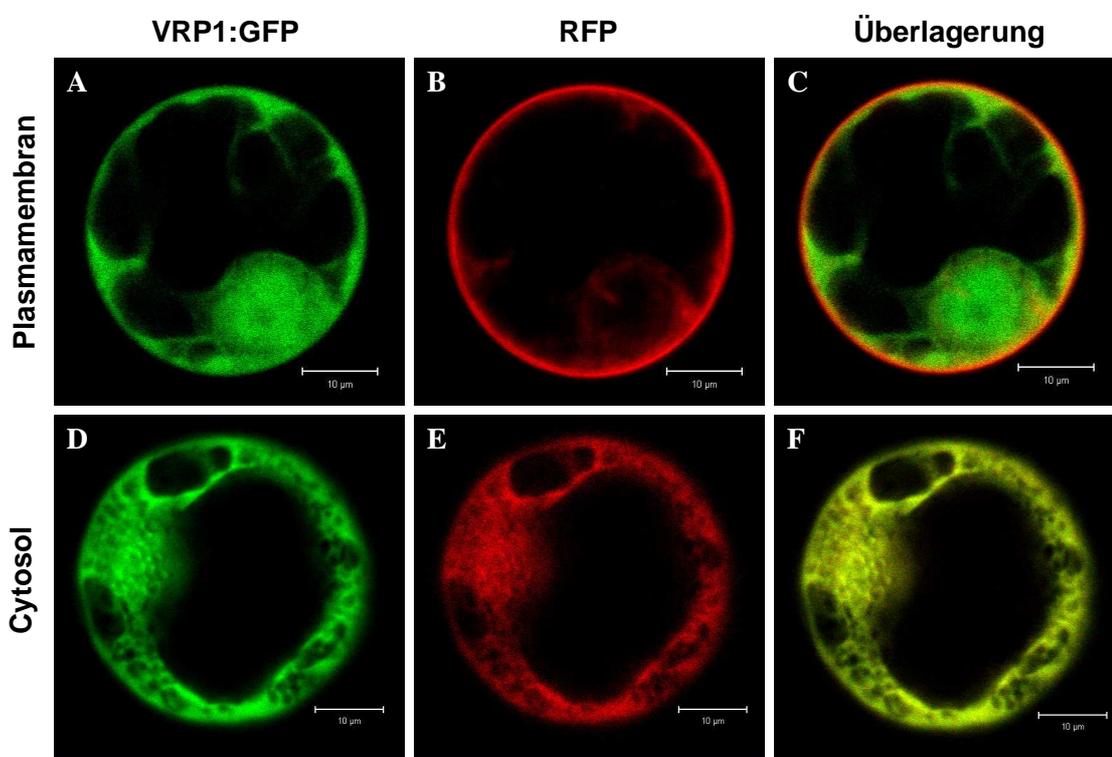
YLOC (Briesemeister et al., 2010); SubLoc (Chen et al., 2005); CELLO (Yu et al., 2004); mPLoc (Chou et al., 2010); slplocal2 (Matsuda et al., 2005); OCTOPUS (Viklund und Elofsson, 2008); TMPred (Hofmann und Stoffel, 1993); SignalP (Petersen et al., 2011)

Tool	VRP1-1		VRP1-2		VRP1-3	
	Vorhersage	Zuverlässigkeit	Vorhersage	Zuverlässigkeit	Vorhersage	Zuverlässigkeit
<b>YLOC</b>	Cytoplasma	66,07%	Cytoplasma	61,79%	Cytoplasma	78,45%
<b>SubLoc</b>	Cytoplasma	74%	Cytoplasma	84%	Cytoplasma	84%
<b>CELLO</b>	Nukleus	59,40%	Nukleus	45,80%	Nukleus	78,50%
	Cytoplasma	50,70%	Cytoplasma	75,10%	Cytoplasma	40%
<b>mPLoc</b>	Cytoplasma		Cytoplasma		Cytoplasma	
<b>slplocal2</b>	Nukleus oder Cytosol		Nukleus oder Cytosol		Nukleus oder Cytosol	
<b>OCTOPUS</b>	TM-Helix		keine TM-Regionen		keine TM-Regionen	
<b>TMpred</b>	2 starke TM-Helices		1 starke TM-Helix		1 starke TM-Helix	
<b>SignalP</b>	1 Signalpeptid		kein Signalpeptid		kein Signalpeptid	

Bei der Isolation der VRP1 Rezeptoren zeigte sich kein Unterschied in der Primärstruktur der Proteine zwischen der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' und der resistenten Rebsorte 'Regent'. Die bioinformatische Analyse zeigte eine über 80 %-ige Homologie der *VRP1* Gene untereinander und die Verwendung verschiedener Algorithmen in der bioinformatischen Analyse zeigte eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation im Cytosol, konnte aber eine Assoziation zum Endomembransystem nicht ausschließen.

### 4.1.2 Subzelluläre Lokalisation der VRP1:GFP Fusionskonstrukte in Protoplasten mittels Konfokaler Mikroskopie

Zur Klärung der subzellulären Lokalisierung der VRP1 Gene wurden N- und C-terminale Fusionen mit GFP durchgeführt. Es wurde eine mikroskopische Lokalisierung der VRP1 Fusionsproteine in Protoplasten der Rebsorte `Chardonnay` zusammen mit spezifischen RFP (Rot Fluoreszierendes Protein) Fluoreszenzmarkern für verschiedene subzelluläre Kompartimente/Strukturen (Plasmamembran, Tonoplasten, ER, Golgi-Apparat, Cytosol und Plastiden) durchgeführt. Die Colokalisierung der C-terminalen Fusionsproteine aller drei VRP1 Proteine zeigte mit dem RFP Marker für das Cytosol eine Übereinstimmung, wohingegen keine Übereinstimmung mit dem RFP Marker für die Plasmamembran (TM-23) vorhanden war (**Abbildung 4.3**).



**Abbildung 4.3: Konfokale Bilder der Fluoreszenzsignale der VRP1:GFP Fusionsproteine und der RFP Marker für das Cytosol und die Plasmamembran (TM-23).**

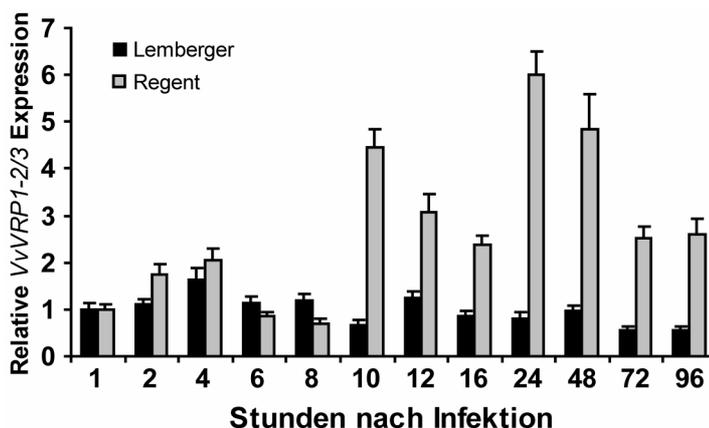
Alle drei VRP1 Fusionskonstrukte wurden im Cytoplasma lokalisiert. (A-D) Protoplasten aus Suspensionszellkultur von *Vitis vinifera* cv. `Chardonnay` 24 h nach Elektroporation. (A,D) C-terminale VRP1:GFP Fusionsproteine. (B) TM23-RFP (Plasmamembran Marker). (E) RFP (Cytosol Marker). (C,F) Überlagerung der GFP und RFP Signale. Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

Während der konfokalen Mikroskopie zeigte sich zusammenfassend durch Cotransformation der VRP1:GFP Fusionskonstrukte mit RFP Organellmarkern in Protoplasten, dass alle drei VRP1 Proteine im Cytoplasma lokalisiert waren.

### 4.1.3 Transkriptionelle Analyse der *VRP1* Rezeptoren in Weinreben nach Inokulation mit *Plasmopara viticola*

Da die Offenen Leserahmen (ORF) der *VRP1* Gene keinen Unterschied zwischen 'Lemberger' und 'Regent' zeigten und alle drei *VRP1* Proteine im Cytoplasma lokalisiert werden konnten, wurden im nächsten Schritt die Unterschiede in der Expression der *VRP1* Gene zwischen dem anfälligen 'Lemberger' und dem resistenten 'Regent' näher untersucht.

Hiezu wurden *P. viticola* infizierte Blattscheiben zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Transkription der *VRP1* Gene mittels qPCR untersucht (**Abbildung 4.4**). Hierbei konnte eine *VRP1-1* Induktion während der gesamten Infektionsdauer in beiden Rebsorten nicht detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden *VRP1-2* und/oder *VRP1-3* in der resistenten Rebsorte 'Regent' stark induziert. Auf Grund der Sequenzhomologie von über 80 % konnte mittels qPCR nicht zwischen *VRP1-2* und *VRP1-3* unterschieden werden. Bereits nach 10 h konnte eine 4,5-fache Expression detektiert werden. Diese erreichte im weiteren Verlauf bei 24 h mit einer etwa 6-fachen Hochregulierung ihr Maximum. In der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' hingegen, ließ sich keine Induktion der Genexpression messen (**Abbildung 4.4**).



**Abbildung 4.4: Zeitprofil der Transkriptmenge von *VvVRP1-2* und/oder *VvVRP1-3* in Weinrebenblättern von *Vitis vinifera* cv. 'Lemberger' und 'Regent' nach Infektion mit Falschem Mehltau.**

Blattscheiben wurden mit 50  $\mu$ l Tropfen einer 50.000 Sporangien/ml Suspension von *P. viticola* inokuliert und die Blattscheiben zu den angegebenen Zeitpunkten in Stunden nach Infektion für die RNA Isolation aufgeschlossen. Messungen erfolgten mittels qPCR unter Verwendung genspezifischer Primer und wurden korrigiert zum konstitutiv exprimierten Haushaltsgen *VvUbiquitin1* und normalisiert zur Wasserkontrolle (Mock Infektion). Die Balken zeigen die Messwerte von drei unabhängigen qPCR Replikaten mit Angabe der Standardabweichung.

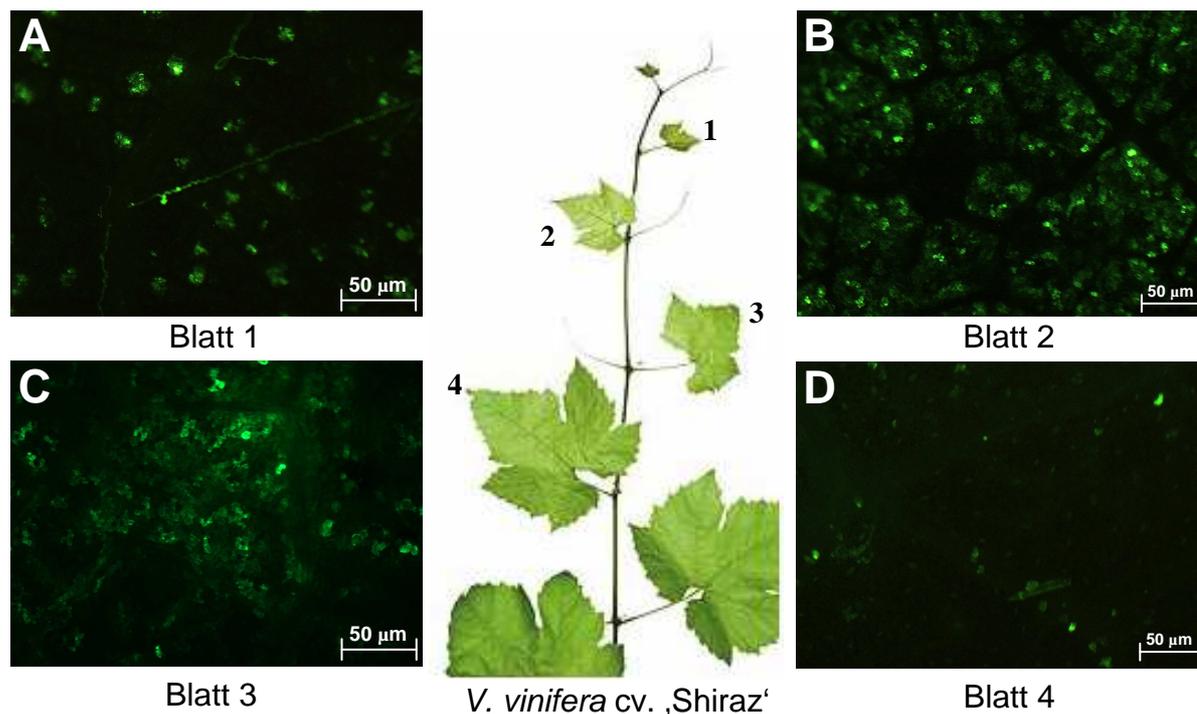
Mittels der transkriptionellen Analyse der *VRP1* Gene in *P. viticola* infizierten Weinrebenblättern zeigte sich, dass in der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' *VRP1* nicht induziert wurde. In der resistenten Rebsorte 'Regent' hingegen, zeigte sich eine deutliche *VRP1* Induktion bereits zehn Stunden nach Inokulation.

#### **4.1.4 Funktioneller Nachweis der VRP1 Rezeptoren gegen *Plasmopara viticola* Infektion durch transiente Transformation in *Vitis vinifera***

Für die funktionelle Analyse der VRP1 Rezeptoren in Weinreben wurde eine transiente Transformation der Rezeptoren in Weinrebenblättern durchgeführt. Mittels anschließender Infektion wurde der Einfluss der VRP1 Rezeptoren auf die Resistenz untersucht. Das Testsystem für die Agrobakterien-vermittelte Vakuuminfiltration von Weinreben zur transienten Expression von Kandidatengenen in Blättern wurde in Zusammenarbeit mit Janine Höll (Dissertation J. Höll, 2014) auf der Grundlage des Protokolls von Günther Buchholz, RLP Agrosience, Neustadt (unpubliziert) entwickelt.

##### **4.1.4.1 Etablierung der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Infiltration zur transienten Expression von Kandidatengenen in der Weinrebe**

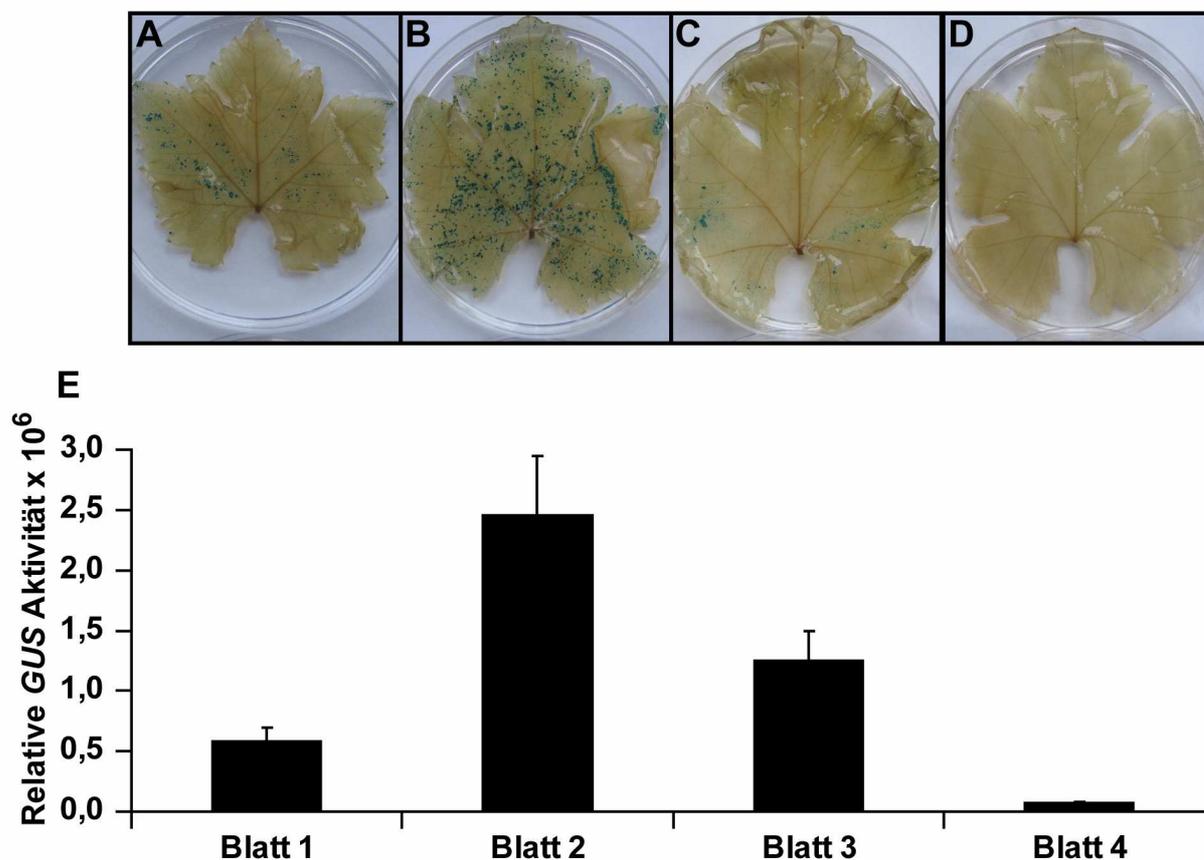
Im Vergleich zur Blattinfiltration in Tabak oder Arabidopsis zeigte sich in der Weinrebe eine starke Variation der Transformationseffizienz (1-80 %) in Abhängigkeit von vielen Faktoren. Da eine starke Abhängigkeit der Transformationseffizienz vom Alter der Pflanze und der Größe der Blätter festgestellt werden konnte, wurden für die Versuche etwa 10-12 Wochen alte und ca. 30 cm große Pflanzen verwendet, weil diese in den Vorversuchen die höchsten Transformationseffizienzen zeigten. Es zeigte sich ferner, dass die verschiedenen Rebsorten unterschiedlich gut für die Infiltrationsversuche geeignet waren. Einige Rebsorten wie beispielsweise *Vitis vinifera* cv. 'Lemberger' ließen sich auf Grund der stabilen Beschaffenheit der Blätter fast gar nicht infiltrieren, wohingegen 'Regent' sich zwar gut infiltrieren ließ, aber eine zu geringe Transformationseffizienz zeigte. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass sich an einer Pflanze nur die Blätter 1-4, gezählt vom Apex (wobei Blatt 1 > 2,5 cm sein musste), gut infiltrieren ließen (**Abbildung 4.5**).



**Abbildung 4.5: Mikroskopische Aufnahmen der GFP Fluoreszenz nach Agrobakterien-vermittelter Vakuumfiltration in Weinrebenblättern von *Vitis vinifera* cv. 'Shiraz' (Merz et al., 2014).**

(A-D) Bilder wurden mit dem Stereomikroskop SteREO Lumar V12 (Zeiss) mit einem eGFP Filter (380 nm Anregung, 480 nm Emission) bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen. (A) Erstes voll entfaltetes Blatt (Blatt 1) gezählt vom Apex mit einer Hauptblattadernlänge von 3-5 cm. (B) Blatt 2 mit einer Hauptblattadernlänge von 4-6 cm (C) Blatt 3 mit einer Hauptblattadernlänge von 6-8 cm. (D) Blatt 4 mit einer Hauptblattadernlänge von 8-10 cm.

An Hand des GFP Signals in den Blättern konnte eine Transformationseffizienz von 10-30 % in Blatt 1, 70-90 % in Blatt 2, 30-80 % in Blatt 3 und 10-20 % in Blatt 4 ermittelt werden. Für die Kalkulation der Transformationseffizienz wurde neben der Fluoreszenzbestimmung auch das Lumineszenz-Basiertes System zur Bestimmung der *GUS*-Aktivität etabliert (**Abbildung 4.6E**). Die *GUS*-Färbung wurde zusätzlich zur Veranschaulichung der Transformationseffizienzen durchgeführt (**Abbildung 4.6A-D**).



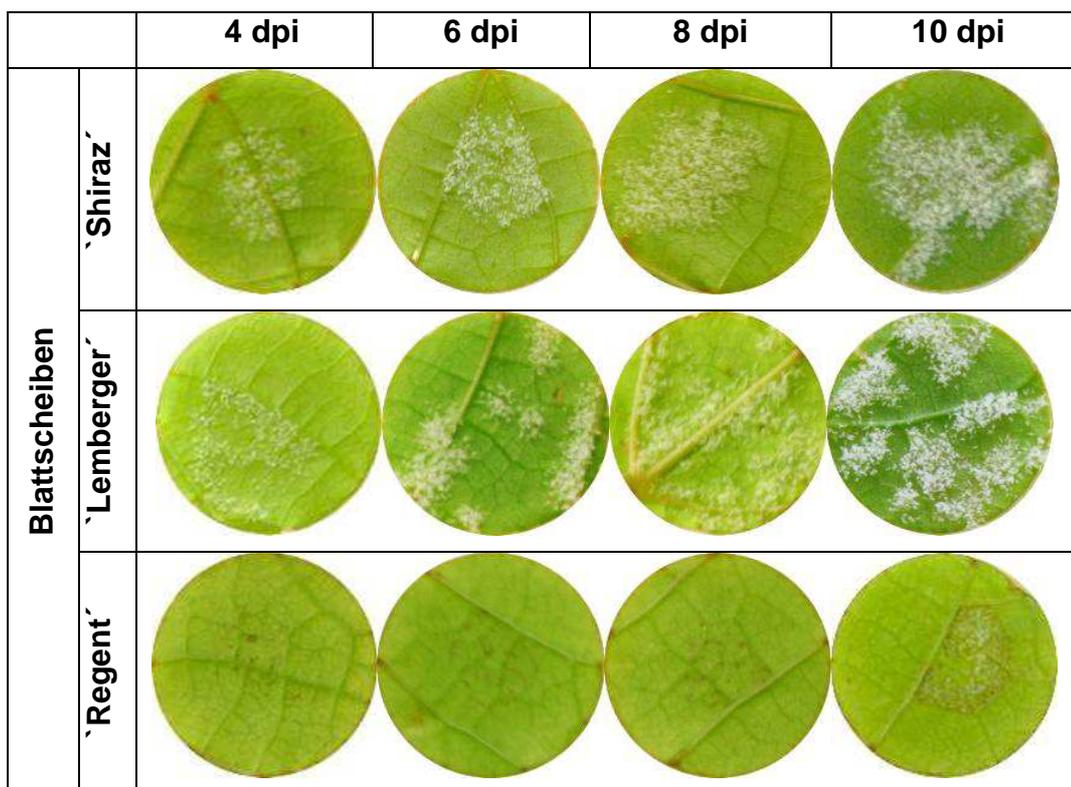
**Abbildung 4.6:** Bestimmung der *GUS*-Aktivität nach Umsetzung des Substrates X-Gluc in Weinrebenblättern von *Vitis vinifera* cv. 'Shiraz' nach Agrobakterien-vermittelter Vakuuminfiltration.

(A-D): Bilder wurden mit der Canon EOS 600D (Canon) aufgenommen. (A) Erstes voll entfaltetes Blatt (Blatt 1) gezählt von oben mit einer Hauptblattadernlänge von 3-5 cm. (B) Blatt 2 mit einer Hauptblattadernlänge von 4-6 cm. (C) Blatt 3 mit einer Hauptblattadernlänge von 6-8 cm. (D) Blatt 4 mit einer Hauptblattadernlänge von 8-10 cm. Bei der Umsetzung von X-Gluc entsteht ein indigoblauer Farbstoff. (E) Bestimmung der relativen *GUS* Aktivität durch Messung des Lumineszenzsignals bei der Umsetzung von 1,2-Dioxetane im Luminometer. Balken geben den Mittelwert von zehn transformierten Pflanzen mit Standardabweichung an.

Durch zahlreiche Vorversuche konnte ermittelt werden, dass Blatt 2 (gezählt vom Apex) von etwa 10-12 Wochen alten und ca. 30 cm großen 'Shiraz' Pflanzen bei der transienten Transformation mittels Agrobakterien-vermittelter Vakuuminfiltration eine reproduzierbare und zugleich etwa 80 %-ige Transformationseffizienz zeigte. Für alle nachfolgenden Infiltrationsversuche wurde daher die anfällige Rebsorte 'Shiraz' ausgewählt, da bei dieser bis zu 100 % der Blattfläche infiltriert und hiervon bis zu 90 % transformiert werden konnten (**Abbildung 4.5**).

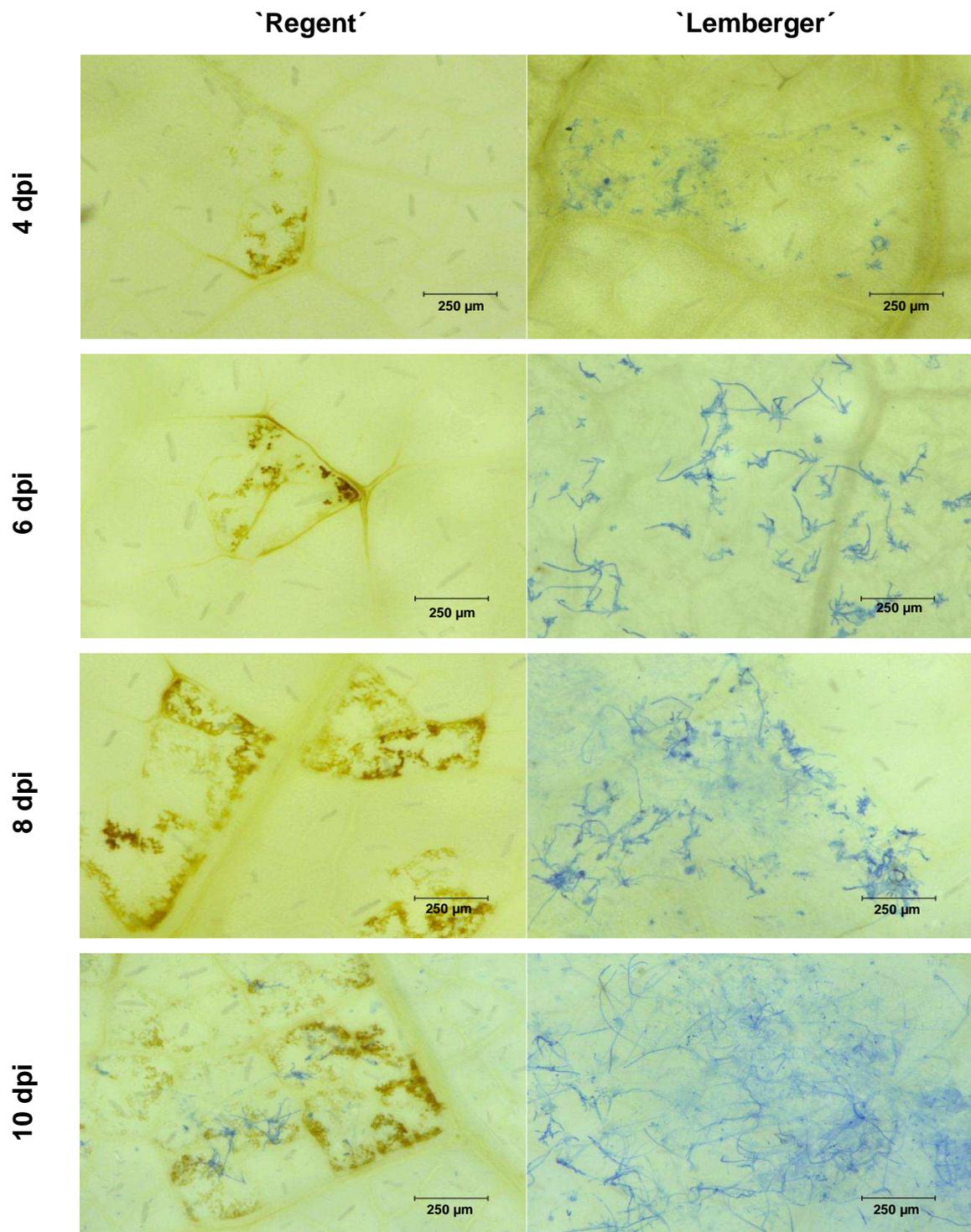
#### 4.1.4.2 Etablierung der Blattscheibeninfektion von Weinreben mit *Plasmopara viticola*

Der Unterschied des Infektionsverlaufs bei nicht transformierten *V. vinifera* cv. 'Lemberger' und 'Regent' Pflanzen wurde makroskopisch (Abbildung 4.7) und mikroskopisch (Abbildung 4.8) untersucht. Die *P. viticola* Tropfeninfektion der ausgestanzten Blattscheiben zeigte makroskopisch bereits 4 Tage nach Infektion (dpi) erste Sporulationen bei der Rebsorte 'Lemberger'. Der progressive Verlauf der Infektion erreichte bei 'Lemberger' bereits 6-8 dpi sein Maximum, was sich durch die sehr starke Sporulation erkennen ließ. Bei 'Regent' ließen sich 4 dpi schon die ersten nekrotischen Bereiche beobachten. 8-10 dpi konnten bei 'Regent' neben großflächigen Nekrosen auch einzelne Sporulationen detektiert werden (Abbildung 4.7). Eine weitere Inkubation der Blattscheiben bis 10 dpi zeigte keine Steigerung der Infektion mehr und resultierte lediglich in der Seneszenz der Blattscheiben. Daher wurden in allen nachfolgenden Versuchen die Auswertung des Infektionsgrades 7 Tage nach Infektion durchgeführt.



**Abbildung 4.7:** Makroskopischer Vergleich des Infektionsverlaufs nach Inokulation mit *P. viticola* auf Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. 'Shiraz', 'Lemberger' und 'Regent' (Bachelorarbeit J. Genné, 2012).

Bilder wurden mit einer Canon EOS 300D (Canon) von Tag vier bis Tag zehn nach der Infektion (dpi) aufgenommen. Die Blattscheiben wurden mit 50 µL Tropfen einer 50.000 Sporangien/ml Suspension inokuliert. Fotos zeigen repräsentative Blattscheiben zu den angegebenen Zeitpunkten.



**Abbildung 4.8: Mikroskopischer Vergleich des Infektionsverlaufs nach Inokulation mit *P. viticola* auf Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. 'Regent' und 'Lemberger' (Bachelorarbeit J. Genné, 2012).**

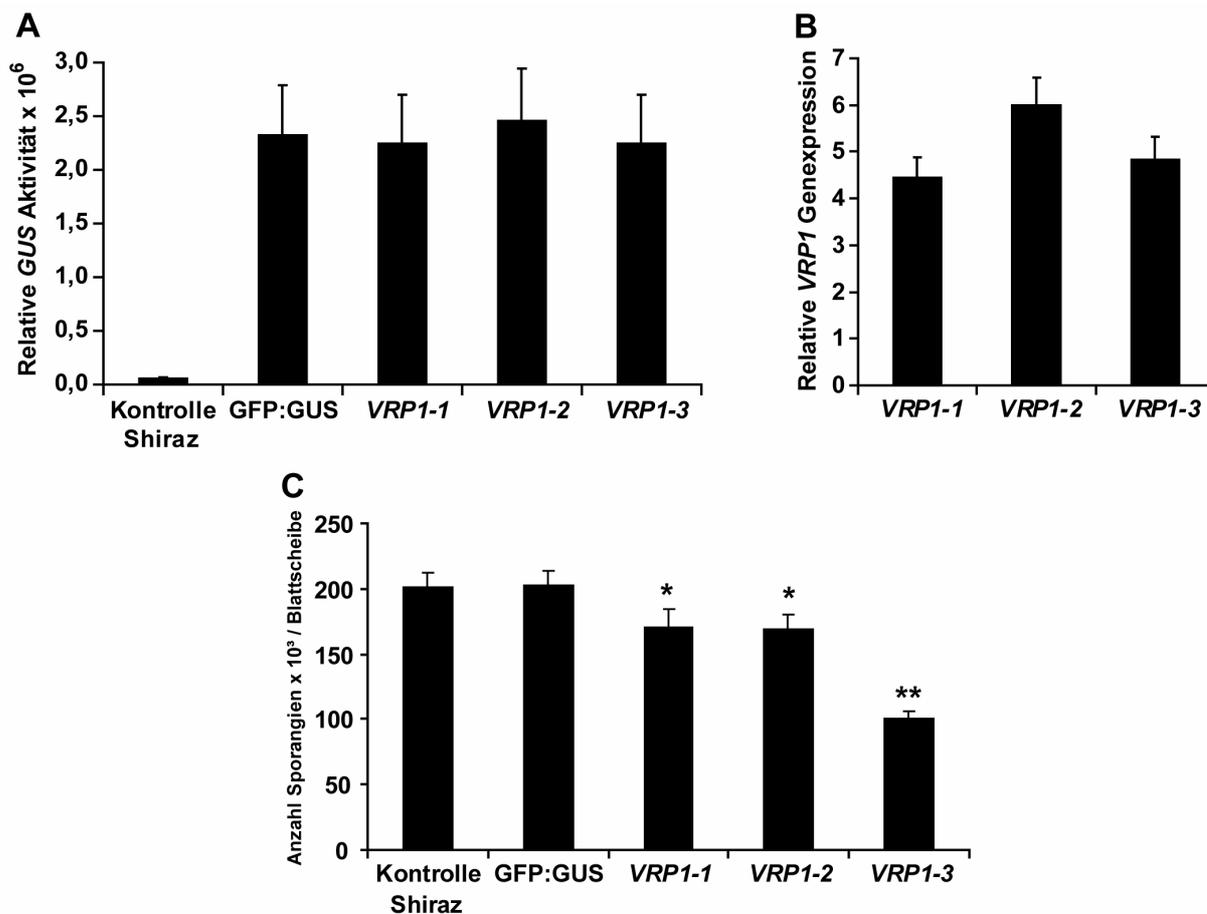
Bilder wurden mit dem Mikroskop VHX-500F (Keyence) von Tag vier bis Tag zehn nach der Infektion (dpi) aufgenommen. Die Blattscheiben wurden mit 50 µL Tropfen einer 50.000 Sporangien/ml Suspension inokuliert. Pilzliche Strukturen wurden mittels Anilinblau gefärbt. Nekrotische Bereiche verfärben sich hierbei braun. Maßstabsbalken entspricht 250 µm. Die Aufnahmen zeigen repräsentative Ausschnitte zu den angegebenen Zeitpunkten.

Die Anfälligkeit von `Shiraz`, welcher für die Infiltrationen verwendet wurde, gegen den Falschen Mehltau war sowohl makroskopisch wie auch mikroskopisch vergleichbar mit der Anfälligkeit von `Lemberger` welcher für die Genexpressionsstudien verwendet wurde (**Abbildung 4.16**). Mikroskopisch zeigte sich in der asexuellen Entwicklung des Omyceten *P. viticola* 24-72 Stunden nach Infektion (hpi) zwischen `Lemberger` und `Regent` noch kein Unterschied. Daher wurden zur Veranschaulichung Bilder von vier bis zehn Tagen nach Inokulation für die Färbung und anschließende Mikroskopie verwendet (**Abbildung 4.8**).

Bei der Etablierung der Infektion von Weinreben mit *P. viticola* konnte gezeigt werden, dass eine Inokulation von Blattscheiben mittels eines 50 µl Tropfens einer 50.000 Sporangien/ml Suspension mit einer Auswertung des Infektionsgrades sieben Tage nach Inokulation reproduzierbare und eindeutige Ergebnisse hervorbrachte.

#### **4.1.4.3 Nachweis der gesteigerten Resistenz gegen *Plasmopara viticola* nach Transformation der *VRP1* Rezeptoren in Weinrebenblättern**

Zum funktionellen Nachweis der *VRP1* Rezeptoren bei Befall mit *P. viticola* wurden die *VRP1* Konstrukte zunächst transient in Weinrebenblätter transformiert und anschließend der Unterschied nach Infektion mit Falschem Mehltau ausgewertet. Mit Hilfe der Agrobakterien-vermittelten Vakuuminfiltration konnten die *VRP1* Konstrukte transient in Blättern von Gewächshausreben exprimiert werden. Über die Messung der *GUS* Aktivität konnte bestätigt werden, dass die Transformationseffizienz in den verwendeten Pflanzen vergleichbar war (**Abbildung 4.9A**). Darüber hinaus konnte die Induktion der *VRP1* Gene in den infiltrierten Pflanzen über qPCR Messungen verifiziert werden (**Abbildung 4.9B**). Die Infektion der nicht infiltrierten `Shiraz` Kontrollpflanzen zeigte im Vergleich zu den GFP (Mock) infiltrierten Pflanzen keine Auswirkung auf die Resistenz. Lediglich die Transformation mit *VRP1-3* brachte eine sehr signifikante Verbesserung der Resistenz nach Infektion mit Falschem Mehltau (**Abbildung 4.9C**). Die Resistenzsteigerung durch die Expression von *VRP1-3* ließ sich hier deutlich durch eine etwa 50 % geringere Sporulationsrate erkennen. Die Transformation mit *VRP1-1* und *VRP1-2* bewirkte eine Verringerung der Sporulation um knapp 10 %, was statistisch bereits als signifikant angesehen werden konnte.



**Abbildung 4.9: Auswertung der Infektion verschiedener Weinreben mit *Plasmopara viticola*.**

Zehn Wochen alte *Vitis vinifera* cv. 'Shiraz' Pflanzen wurden mittels Agrobakterien-vermittelter Vakuuminfiltration mit den angegebenen Genen transformiert und Blattscheiben fünf Tage nach Infiltration mit 50 µl Tropfen einer 50.000 Sporangien/ml Suspension inokuliert. Sieben Tage nach Inokulation wurden die Sporangien von den einzelnen Blattscheiben heruntergewaschen und mittels eines Hämozytometers ausgezählt.

(A) Vergleich der Transformationseffizienzen über Messung der *GUS* Aktivität.

(B) Messung der relativen *VRP1* Genexpression mittels qPCR unter Verwendung genspezifischer Primer, normalisiert zum konstitutiv exprimierten Haushaltsgen *VvUbiquitin1* und relativ zur Infiltrationskontrolle (GFP Infiltration).

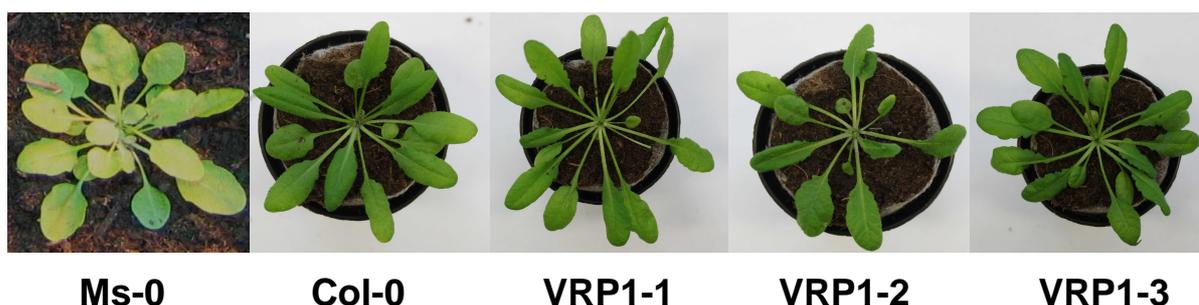
(C) Die Anzahl Sporangien wurde pro Blattscheibe berechnet.

Balken repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 6 individuellen Pflanzen (18 Blattscheiben) mit Angabe der Standardabweichung. Kontrolle Shiraz, nicht infiltrierte Kontrollpflanzen; GFP, GFP (Mock) infiltrierte Pflanzen; VRP1-1/2/3, transgene transient VRP1 exprimierende Weinreben; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$

Die ektopische Expression der drei VRP1 Konstrukte mittels Agrobakterien-vermittelter Vakuuminfiltration in Weinrebenblättern der anfälligen Rebsorte 'Shiraz' zeigte, dass die beiden Gene VRP1-1 und VRP1-2 eine etwa 10 %-ige und VRP1-3 sogar eine 50 %-ige Resistenzsteigerung gegen *P. viticola* hervorrufen konnte.

#### 4.1.5 Funktioneller Nachweis der VRP1 Rezeptoren gegen *Hyaloperonospora arabidopsidis* Infektion durch stabile Transformation in *Arabidopsis thaliana*

Zusätzlich zum funktionellen Nachweis über die transiente Transformation in Weinreben, wurden im letzten Schritt Versuche zur funktionellen Charakterisierung der VRP1 Proteine nach stabiler Transformation in *Arabidopsis* durchgeführt. Der Ökotyp Ms-0 (Moscow Wildtyp) verfügt in seinem Genom über 2 *RPW8* Gene und zeigt eine Resistenz gegen ein breites Spektrum von Pathogenen wie den Mehltauerregern. Im Ökotyp Col-0 (Columbia Wildtyp) sind die beiden *RPW8* Gene durch ein *HR4* (Hypersensitive Response) Gen ersetzt. Dies ist mit ein Grund dafür, dass die Pflanzen sehr anfällig für viele verschiedene Pathogene wie den Echten Mehltau sind (Xiao et al. 2004). Zur funktionellen Charakterisierung wurden daher die *VRP1* Gene über Floral-Dip stabil in Col-0 transformiert. Die verwendeten VRP1 exprimierenden Linien zeigten keine phänotypischen Veränderungen zum Col-0 Wildtyp (**Abbildung 4.10**).

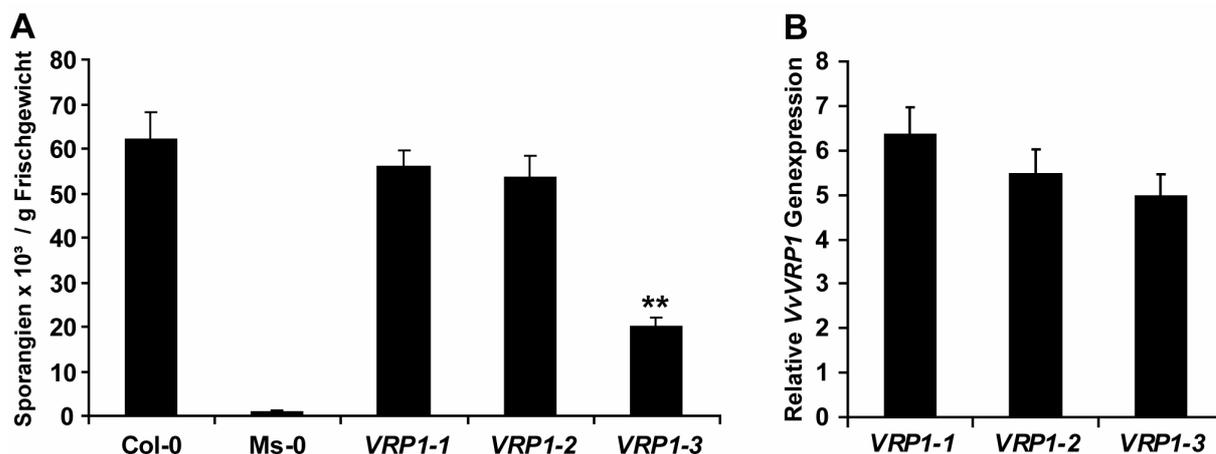


**Abbildung 4.10:** Fotografische Aufnahmen von 4 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen vor der Inokulation mit *H. arabidopsidis* und *B. cinerea*.

Bilder wurden mit einer Canon EOS 600D (Canon) aufgenommen. Die verschiedenen transgenen Linien zeigten keine offensichtlichen Veränderungen des Phänotyp im Vergleich zu den Wildtyp Kontrollpflanzen.

Col-0, Columbia Wildtyp; Ms-0, Moscow Wildtyp; VRP1-1/2/3, transgene stabil VRP1 exprimierende *Arabidopsis* Pflanzen

In einer anschließenden Infektion der *Arabidopsis* Pflanzen mit dem zur Weinrebe analogen Pathogen für den Falschen Mehltau (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) konnte gezeigt werden, dass lediglich eine VRP1-3 Expression eine Steigerung der Resistenz bewirkte (**Abbildung 4.11A**). Die Resistenz in der stabil VRP1-3 exprimierenden Linie konnte um fast 70 % im Vergleich zum elterlichen Wildtyp Col-0 gesteigert werden. Die Kontrolle mit dem resistenten Ms-0 Wildtyp zeigte nur minimale Anzeichen einer Infektion. Die Expression der drei VRP1 Proteine in den transgenen *Arabidopsis* Linien wurde zur Kontrolle mittels qPCR gemessen und konnte als vergleichbar bestätigt werden (**Abbildung 4.11B**).



**Abbildung 4.11: Auswertung der Infektion VRP1 transformierter Arabidopsis Pflanzen mit *Hyaloperonospora arabidopsidis* (NOCO) im Vergleich zu den Wildtypen.**

Zwei Wochen alte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden mit einer 50.000 Sporangien/ml Suspension besprüht. Sieben Tage nach Inokulation wurden die Sporangien von 50 Pflanzen heruntergewaschen und mittels Hämozytometers ausgezählt.

(A) Die Anzahl Sporangien wurde pro g Blattmaterial berechnet.

(B) Messung der relativen VRP1 Genexpression mittels qPCR unter Verwendung genspezifischer Primer, normalisiert zum konstitutiv exprimierten Haushaltsgen *AtActin* und relativ zur Expression im Wildtyp Col-0.

Balken repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 50 Pflanzen mit Angabe der Standardabweichung. Col-0, anfälliger Wildtyp; Ms-0, resistenter Wildtyp; VRP1-1/2/3, transgene stabil VRP1 exprimierende Arabidopsis Linien; \*\*,  $p < 0,01$ .

Die stabile Expression der drei VRP1 Konstrukte im anfälligen Arabidopsis Wildtyp Col-0 mittels Floral-Dip zeigte, dass die beiden Proteine VRP1-1 und VRP1-2 keinen Einfluss auf die Infektion hatten, aber VRP1-3 eine 70 %-ige Resistenzsteigerung gegen *H. arabidopsidis* (Falscher Mehltau an Arabidopsis) hervorrufen konnte. Dies bestätigte die Ergebnisse der transienten Expression in Weinrebenblättern, welche für VRP1-3 eine 50 %-ige Resistenzsteigerung gegen *P. viticola* (Falscher Mehltau an Weinreben) brachte.

## 4.2 Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren der Pathogenabwehr aus der Weinrebe

In Vorarbeiten des Kooperationspartners am JKI, Siebeldingen wurden Genexpressionsanalysen der resistenten Rebsorte 'Regent' im Vergleich zur anfälligen Rebsorte 'Chardonnay' nach Inokulation mit Echtem Mehltau auf Qiagen VitisGeneChip Microarrays mit ca. 14.000 repräsentierten Transkripten der Weinrebe durchgeführt. Hierbei wurden etwa 100 mehr als zweifach induzierte Gene in der frühen Resistenzantwort identifiziert. Hiervon wurden 27 Gene mittels qPCR in ihrer Expression bestätigt und in funktionelle Klassen eingeteilt (Welter, 2008). Darunter befanden sich Transkriptionsfaktoren sieben verschiedener Genfamilien (**Tabelle 4.2**), hoch induzierte *PR* (*pathogenesis related*) Gene und weitere Gene die hier nicht näher untersucht wurden. Die ORFs aller TFs wurden vergleichend aus 'Lemberger' und 'Regent' amplifiziert und sowohl untereinander als auch mit dem Modellgenom von 'Pinot noir' PN40024 in der NCBI Datenbank verglichen (**Tabelle 4.2**).

**Tabelle 4.2: Vergleich der Länge der Transkriptionsfaktoren auf DNA (bp) - und Proteinebene (AS)**

TF	'Lemberger'		'Regent'		'Pinot noir'
	Allel A	Allel B	Allel A	Allel B	PN40024
<b>MYB15</b> (TC42111)	762 bp	-	762 bp	-	762 bp
	253 AS	-	253 AS	-	253 AS
<b>WRKY7</b> (TC42321)	570 bp	-	570 bp	-	570 bp
	189 AS	-	189 AS	-	189 AS
<b>WRKY33</b> (TC47186)	1659 bp	-	1659 bp	-	1659 bp
	552 AS	-	552 AS	-	552 AS
<b>WRKY57</b> (TC46952)	1005 bp	1011 bp	759 bp	1011 bp	1011 bp
	334 AS	336 AS	252 AS	336 AS	336 AS
<b>ERF1</b> (TC50306)	462 bp	-	462 bp	-	549 bp
	153 AS	-	153 AS	-	182 AS
<b>ERF5</b> (TC54435)	828 bp	-	834 bp	834 bp	834 bp
	275 AS	-	277 AS	277 AS	277 AS
<b>CZF1</b> (TC54167)	2070 bp	-	2070 bp	-	2070 bp
	689 AS	-	689 AS	-	689 AS

Die Familie der MYB Faktoren verfügt über eine hochkonservierte DNA Bindedomäne und eine MYB Domäne. Bei *MYB15* zeigten sich acht Basenaustausche (SNPs) die zu vier Aminosäureaustauschen außerhalb aller beschriebenen funktionalen Bereiche der MYB TF Familie führten.

Charakteristisch für TF der WRKY Familie sind die hochkonservierten WRKY Domänen (W-Boxen). Anhand der Anzahl an W-Boxen werden die WRKY Faktoren in verschiedene Klassen eingeteilt. *WRKY7* und *WRKY57* gehörten zur WRKY Klasse II, da sie lediglich über eine WRKY Domäne verfügen. Bei *WRKY7* konnten keine Unterschiede zwischen 'Lemberger' und 'Regent' gefunden werden. Für *WRKY57* konnten jeweils zwei verschiedene Allele kloniert werden. Auf Grund einer Deletion von sechs bp ist das Allel A von 'Lemberger' um zwei Aminosäuren (AS) verkürzt. Eine von drei vorhandenen SNPs führte beim Allel A von 'Regent' zu einem Stop-Codon und somit zur Verkürzung um 84 AS. Die WRKY Domäne blieb hierbei allerdings erhalten. *WRKY33* gehört zur WRKY Klasse I, da hier zwei WRKY Domänen detektiert werden konnten. Auch hier konnte kein Unterschied zwischen 'Lemberger' und 'Regent' festgestellt werden.

ERF TFs können mittels der AP2 Domäne an die DNA von Promotoren binden. Bei *ERF1* zeigte sich, dass dieser im Modellgenom falsch annotiert wurde und nur 153 statt 182 AS lang war. Zwischen 'Lemberger' und 'Regent' konnten sechs SNPs identifiziert werden, die lediglich zum Austausch einer einzelnen AS außerhalb der charakterisierten ERF Domänen führte. Für *ERF5* wurde zunächst angenommen, dass für 'Regent' zwei verschiedene Allele kloniert wurden. Auf Grund der Größe der *ERF5* Familie in Wein und der hohen Homologie (> 90 %) untereinander (Licausi et al., 2010) konnte jedoch festgestellt werden, dass es sich bei den drei klonierten *ERF5* TFs höchstwahrscheinlich um drei verschiedene *ERF* TFs handelte. Die genauen Unterschiede wurden vom Kooperationspartner am JKI, Siebeldingen weiter untersucht (Dissertation T. Moser, 2014).

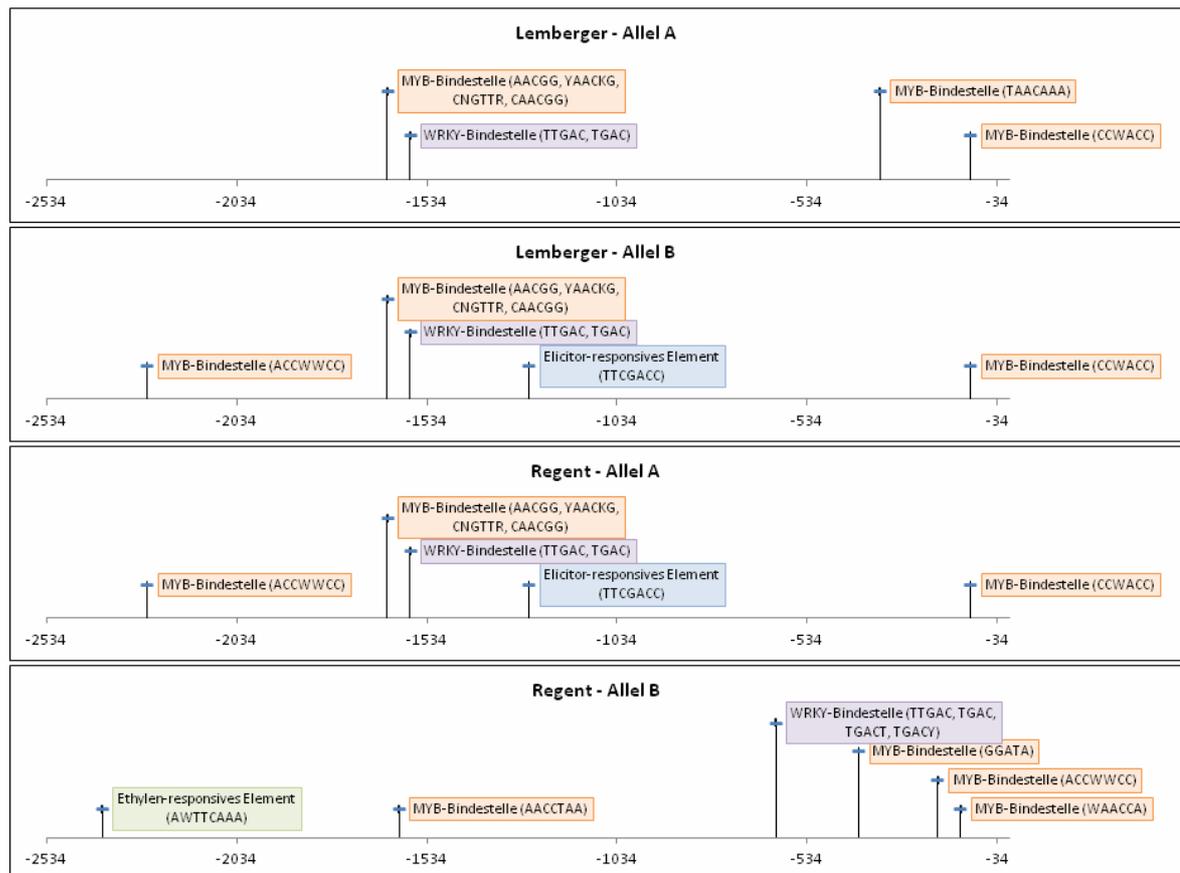
Die Familie der CZF1/ZFAR1 TFs zeichnet sich durch die Zink Finger Domäne (C<sub>3</sub>H<sub>1</sub>) aus. Beim *CZF1* konnten sieben SNPs gefunden werden, die zu vier AS Austauschen außerhalb der Zink Finger Domäne führten.

In der bioinformatischen Analyse zeigten sich nur geringe Unterschiede in den Sequenzen der TF beim Vergleich zwischen der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' und der resistenten Rebsorte 'Regent', die in keinem Fall einen Unterschied innerhalb von charakterisierten funktionalen Domänen der TFs zeigten.

#### **4.2.1 Vergleichende Analyse von Pathogen-induzierten Promotoren**

Da sich nur minimal Unterschiede in den ORFs der TFs zeigten, sollten im Kooperationsprojekt zusätzlich alle Promotoren vergleichend aus den beiden Rebsorten kloniert werden, um die Ursachen der unterschiedlichen Genexpression zwischen der anfälligen und der resistenten Rebsorte zu

untersuchen. Alle Promotoren wurden vom Kooperationspartner am JKI, Siebeldingen kloniert und analysiert. Es wurden jeweils beide Allele von beiden Rebsorten kloniert und verglichen (Dissertation T. Moser, 2014). Aus allen hoch induzierten Genen der Vorarbeiten des Kooperationspartners wurde der Promotor des *Pathogenesis related 10.1 (VvPR10.1)* Gens für die weiteren Experimente ausgewählt, da dieser über eine Vielzahl von *cis*-Elementen für TF der untersuchten Familien (MYB, WRKY, ERF, CZF) verfügte (**Abbildung 4.12**).



**Abbildung 4.12: Darstellung der *cis*-regulativen Elemente für *VvPR10.1*** (Dissertation T. Moser, 2014).

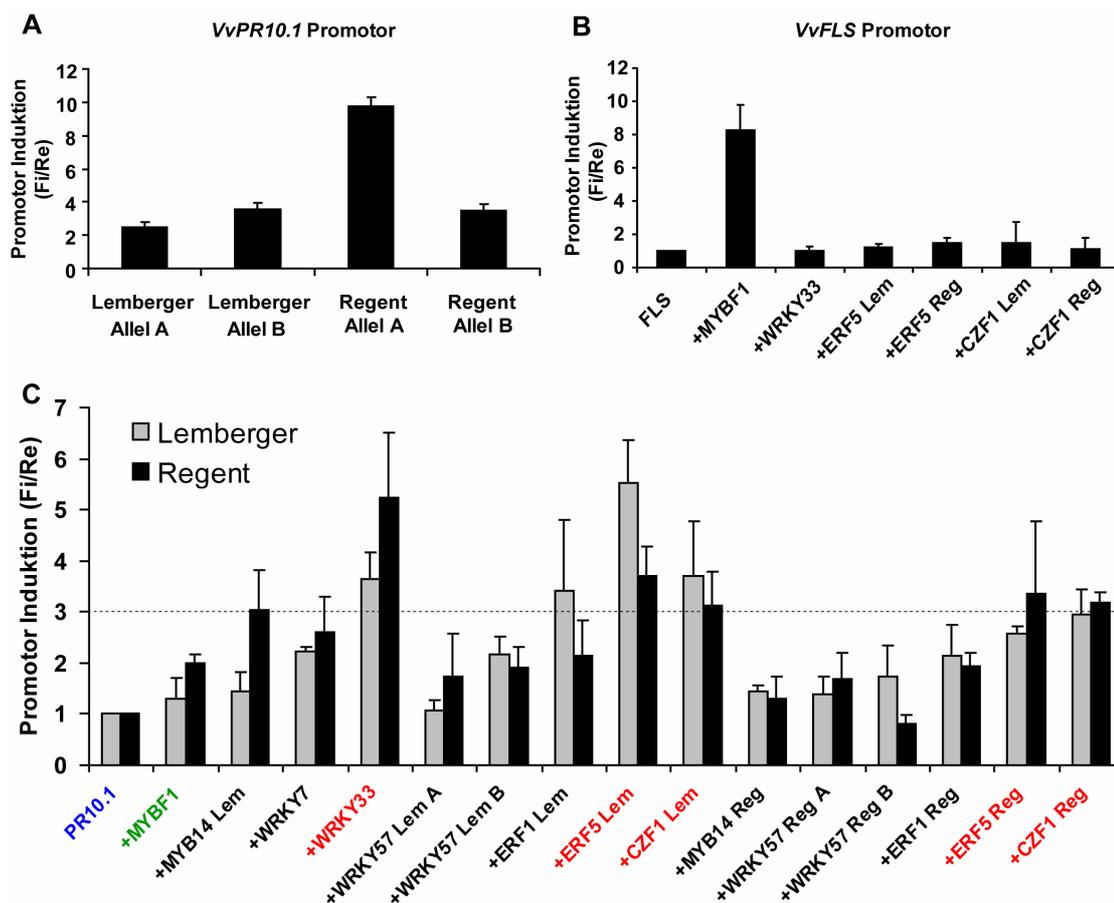
Die Bindestellen von MYB (orange) und WRKY (lila) Transkriptionsfaktoren, sowie Elicitor- (blau) und Ethylen- (grün) responsiven Elementen für die verschiedenen Allele des *VvPR10.1* Promotors von *Vitis vinifera* cv. `Regent` und `Lemberger` wurden mittels PlantCARE, a plant *cis*-acting regulatory element database *in silico* vorhergesagt.

Die Unterschiede der Pathogen-induzierten Promotoren wurden vom Kooperationspartner am JKI, Siebeldingen untersucht (Dissertation T. Moser, 2014). Der Promotor des *VvPR10.1* Gens wurde für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

## 4.2.2 Induktion des *VvPR10.1* Promotors durch verschiedene Transkriptionsfaktoren

Zur Klärung der Aktivierung des *VvPR10.1* Promotors nach Pathogenbefall wurde die Induzierbarkeit des *VvPR10.1* Promotors durch alle genannten TFs (**Tabelle 4.2**) untersucht. Hierzu wurde der Dual Luciferase Assay nach biolistischer Cotransformation des Luciferase Reporterkonstrukts zusammen mit den einzelnen TFs in Suspensionszellen der Rebsorte 'Chardonnay' durchgeführt. Der *VvPR10.1* Promotor wurde zusätzlich alleine transformiert um die Hintergrundaktivität zu vergleichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Promotor des Allels A von 'Regent' eine etwa dreimal höhere Hintergrundaktivität als die anderen drei Promotoren aufwies (**Abbildung 4.13A**). Da keine signifikanten Unterschiede in der Induzierbarkeit zwischen den Allelen A und B gezeigt werden konnte, sind in der **Abbildung 4.13C** die Mittelwerte der beiden Allele angegeben. Die Aktivität wurde als Verhältnis der Firefly Luciferase unter Kontrolle des *VvPR10.1* Promotors zur Renilla Luciferase unter Kontrolle des 35S Promotors zur Kontrolle der Transformationseffizienz berechnet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Hintergrundaktivitäten der verschiedenen Promotorvarianten auf eins normalisiert (**Abbildung 4.13C**).

Als Negativkontrolle wurde der TF *VvMYB1* verwendet, der für die Regulation der Flavonolsynthese verantwortlich ist (Czemmel et al., 2009), aber nicht an der Pathogenabwehr beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression dieses unbeteiligten TFs bereits eine stressbedingte zweifache Induktion des Promotors hervorruft. Um in den anderen Versuchen sicherzugehen, dass es sich um eine spezifische Induktion des Promotors handelt, wurde daher der Schwellenwert auf eine etwa dreifache Induktion festgelegt. Dies war für alle vier Promotorvarianten nur für die TFs *WRKY33*, *ERF5* und *CZF1* nachweisbar (**Abbildung 4.13C**), weshalb diese drei Faktoren für die weiteren Untersuchungen ausgewählt wurden.



**Abbildung 4.13: Induktion des *VvPR10.1* Promotors der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' und der resistenten Rebsorte 'Regent' durch verschiedene Transkriptionsfaktoren** (teilweise in Merz et al., 2014).

*VvPR10.1* wurde ohne und mit den genannten TFs durch Partikelbombardment transient in Suspensionszellen von *Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay' cotransformiert. 48 h nach der Transformation wurden die Zellen aufgeschossen und die Aktivität der beiden Luciferasen (Firefly (Fi) unter Kontrolle des *VvPR10.1* Promotors und Renilla (Re) unter Kontrolle des 35S Promotors) gemessen. Die Zahlen zeigen die relative Induktion des *VvPR10.1* Promotors durch die auf der x-Achse genannten TFs. Jeder Transformationsansatz enthält das Renilla Luciferase Plasmid pRLuc zur Normalisierung der Transformationseffizienz.

(A) Hintergrundaktivität der verschiedenen *VvPR10.1* Promotor Allele aus 'Lemberger' und 'Regent'.

(B) Zum Ausschluss der unspezifischen Induktion von Promotoren wurden als Negativkontrolle die stärksten TFs auch auf dem *VvFLS* Promotor getestet. Zusätzlich wurde der spezifische Induktor *VvMYBF1* mitgetestet.

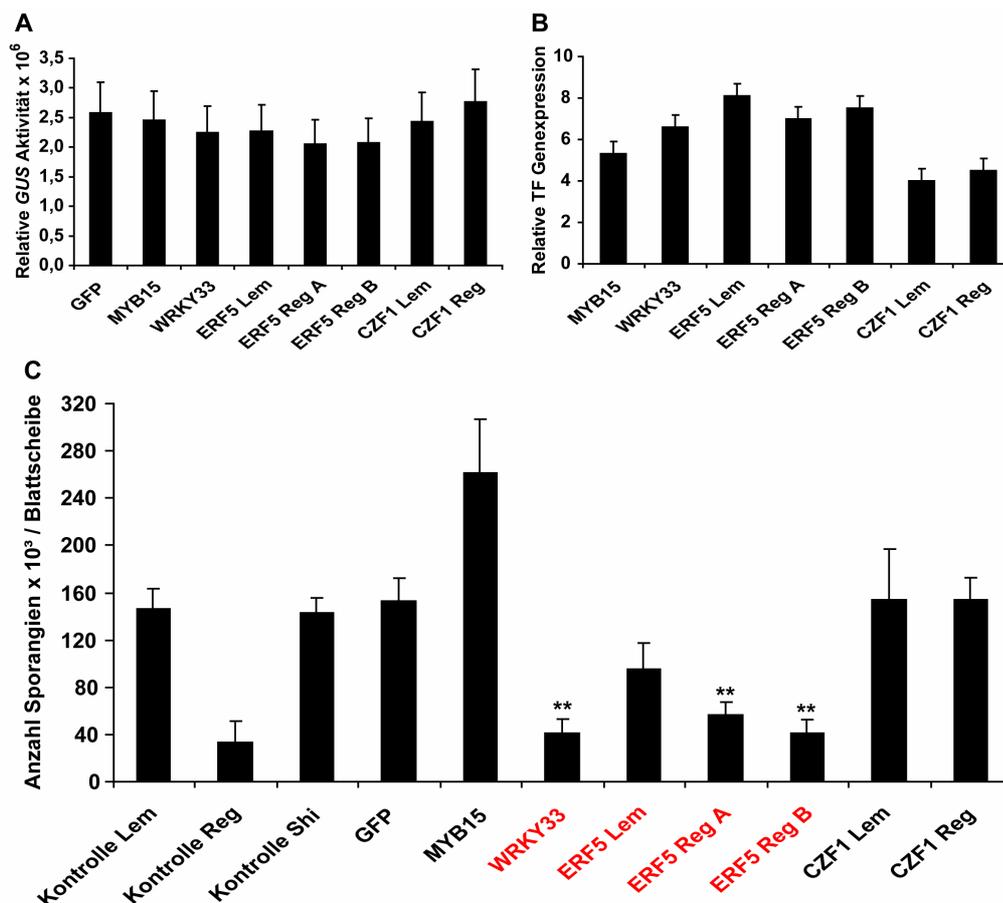
(C) Induktion des *VvPR10.1* Promotors durch die genannten TFs. Die Hintergrundaktivität des *VvPR10.1* Promotors wurde auf eins gesetzt (blau). *VvMYBF1* diente als unbeteiligter TF als Negativkontrolle (grün). TFs die den Promotor nicht spezifisch induzieren konnten (schwarz) und die induzierenden TFs (rot).

Die Balken repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Bombardments mit Angabe der Standardabweichung. Die gestrichelte Linie stellt den Schwellenwerte für eine spezifische Induktion dar.

Mit Hilfe des Dualen Luciferase Assays nach biolistischer Cotransformation der TFs mit dem *VvPR10.1* Promotor in Suspensionszellen der Rebsorte 'Chardonnay' konnten die drei TFs *VvWRKY33*, *VvERF5* und *VvCZF1* als Induktoren des *VvPR10.1* Promotors identifiziert werden.

### 4.2.3 Analyse der ektopischen Expression ausgewählter Transkriptionsfaktoren mit anschließender *Plasmopara viticola* Infektion in der Weinrebe

Im nächsten Schritt sollte die Funktion der drei gefundenen TFs während der Infektion der Weinrebe mit Falschem Mehltau untersucht werden. Zur funktionellen Charakterisierung der ausgesuchten TFs wurden diese daher zunächst mittels Agrobakterien-vermittelter Vakuuminfiltration transient in Weinrebenblätter transformiert. Anschließend wurden die Blätter in Blattscheibeninfektionstest auf die veränderte Resistenz gegenüber dem Pathogen hin untersucht. Zur Kontrolle wurden nicht transformierte Pflanzen der Rebsorten `Lemberger` und `Shiraz` verwendet. Diese zeigten keinen Unterschied zu den GFP (Mock) infiltrierten Weinreben. Zum besseren Vergleich des Resistenzniveaus wurde die nicht transformierte resistente Rebsorte `Regent` verwendet, welche nur eine sehr geringe Infektion zeigte (**Abbildung 4.14C**). Die *GUS* Aktivität zur Bestätigung der Transformationseffizienz war bei allen transformierten Pflanzen vergleichbar (**Abbildung 4.14A**). Über qPCR Messungen mittels genspezifischer Primer konnte zusätzlich die spezifische Überexpression der einzelnen TFs in den jeweiligen transformierten Pflanzen bestätigt werden (**Abbildung 4.14B**). Die Überexpression der TFs führte bei *VvWRKY33* und *VvERF5* aus `Regent` zu einer Verbesserung der Resistenz gegenüber *P. viticola*, bei *VvMYB15* zu einer Verschlechterung der Resistenz und hatte bei *VvCZF1* keinen Einfluss auf die Abwehr des Falschen Mehltaus (**Abbildung 4.14C**).



**Abbildung 4.14: Auswertung der Infektion verschiedener Weinreben mit *Plasmopara viticola*** (teilweise in Merz et al., 2014).

Zehn Wochen alte *Vitis vinifera* cv. 'Shiraz' Pflanzen wurden mittels Agrobakterien-vermittelter Vakuumfiltration mit den angegebenen Genen transformiert und Blattscheiben nach fünf Tagen mit 50 µl Tropfen einer 50.000 Sporangien/ml Suspension inokuliert. Sieben Tage nach Inokulation wurden die Sporangien von den einzelnen Blattscheiben heruntergewaschen und mittels Hämocytometers ausgezählt.

(A) Vergleich der Transformationseffizienzen über Messung der *GUS* Aktivität.

(B) Messung der relativen *TF* Genexpression mittels qPCR unter Verwendung genspezifischer Primer, korrigiert zum konstitutiv exprimierten Haushaltsgen *VvUbiquitin1* und normalisiert zur Infiltrationskontrolle (GFP Infiltration).

(C) Die Anzahl Sporangien wurde pro Blattscheibe berechnet.

Balken repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 6 individuellen Pflanzen (18 Blattscheiben) mit Angabe der Standardabweichung. Kontrolle Lem / Reg / Shi, nicht infiltrierte 'Lemberger' / 'Regent' / 'Shiraz' Kontrollpflanzen; GFP, GFP (Mock) infiltrierte Pflanzen; Lem, 'Lemberger'; Reg, 'Regent'; A, Allel A; B, Allel B; \*\*,  $p < 0,01$ .

Die Überexpression von *VvMYB15* führte zu einer Erhöhung der Sporulation und somit zu einer gesteigerten Anfälligkeit gegen den Falschen Mehltau. Eine starke Expression des *WRKY33* hingegen reduzierte die Sporulation um etwa 70 % und konnte somit die Resistenz signifikant steigern. Das Resistenzniveau lag hier nur noch knapp über dem der resistenten Rebsorte 'Regent', die zur Veranschaulichung in der **Abbildung 4.14C** mit eingefügt wurde. Bei *ERF5* zeigte sich, dass der TF aus 'Lemberger' nur einen sehr geringen Einfluss auf die Resistenzantwort hatte. Im Gegensatz dazu konnten aber die beiden Allele A und B aus 'Regent' beide die Resistenz um 50-70 % steigern. Bei

*CZF1* hingegen zeigte sich, dass weder die Überexpression des TF aus 'Lemberger' noch aus 'Regent' einen Einfluss auf die Resistenz hatte. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die TFs *WRKY33* sowie *ERF5* noch näher untersucht. *ERF5* wurde vom Kooperationspartner am JKI, Siebeldingen charakterisiert (Dissertation T. Moser, 2014).

Zusammengefasst konnte durch transiente Expression der TFs mittels Agrobakterien-vermittelter Vakuuminfiltration in Weinrebenblättern der anfälligen Rebsorte 'Shiraz' gezeigt werden, dass die Überexpression von *VvWRKY33* und *VvERF5* eine Steigerung der Resistenz gegen *P. viticola* um bis zu 70 % bewirken konnte.

#### 4.2.3.1 Untersuchung der zeitabhängigen *VvWRKY33* Expression in infiltrierten Weinreben und dem Einfluss auf die Resistenz

Da sich für *VvWRKY33* eine wichtige Funktion in der Resistenz zeigte, wurde der Versuch in einer Zeitreihe wiederholt. Der Einfluss des TF auf die Resistenz wurde zwischen 0 und 6 Tagen nach Infiltration beobachtet (Abbildung 4.15).

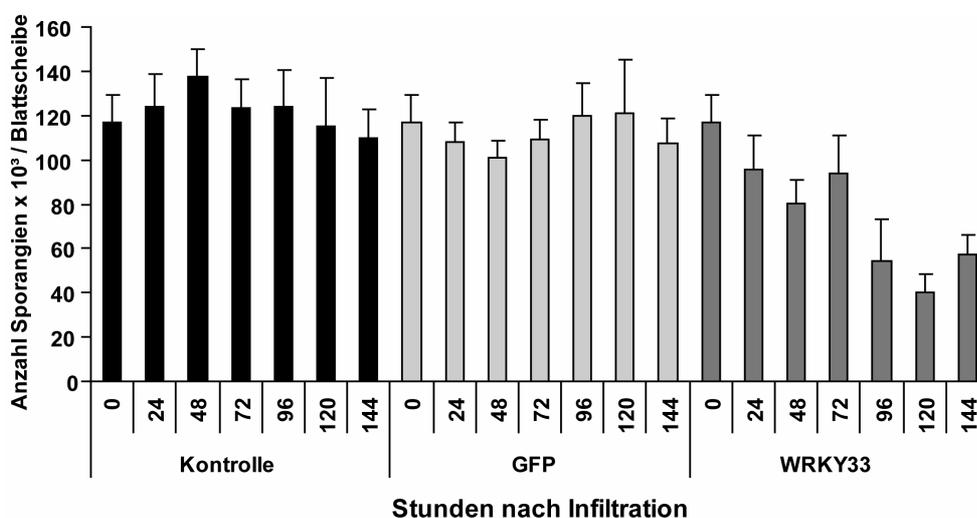
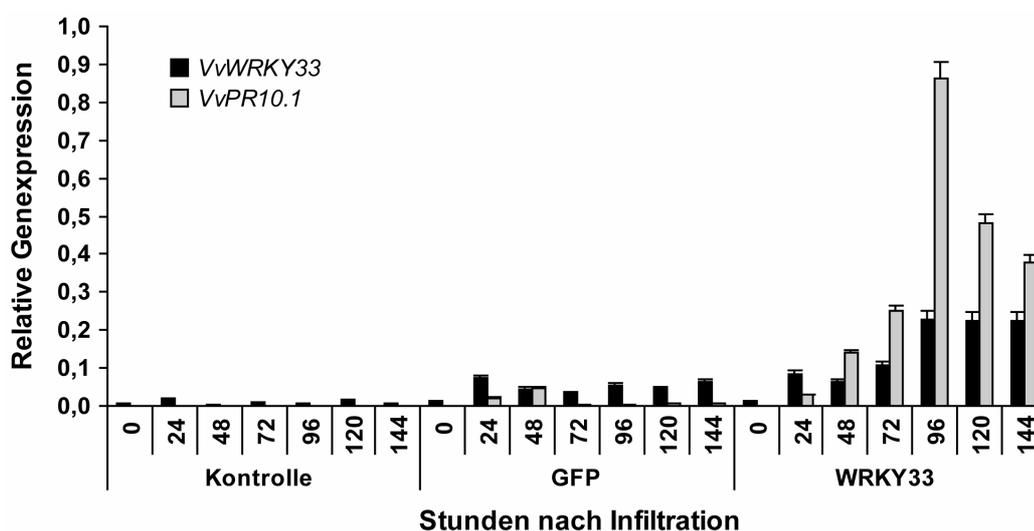


Abbildung 4.15: Auswertung der Infektion mit *Plasmopara viticola* nach Infiltration der Weinreben mit verschiedenen Konstrukten (Merz et al., 2014).

Zehn Wochen alte *Vitis vinifera* cv. 'Shiraz' Pflanzen wurden mittels Agrobakterien-vermittelter Vakuuminfiltration mit den angegebenen Genen transformiert und Blattscheiben zwischen null und sechs Tagen mit 50 µl Tropfen einer 50.000 Sporangien/ml Suspension inokuliert. Sieben Tage nach Inokulation wurden die Sporangien von den einzelnen Blattscheiben heruntergewaschen und mittels Hämocytoometers ausgezählt. Die Anzahl Sporangien wurde pro Blattscheibe berechnet. Balken repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 6 individuellen Pflanzen (18 Blattscheiben) mit Angabe der Standardabweichung. Kontrolle, nicht infiltrierte Kontrollpflanzen; GFP, GFP (Mock) infiltrierte Pflanzen; WRKY33, *VvWRKY33* infiltrierte Pflanzen.

Die Ergebnisse bestätigten, dass es auch im zeitlichen Verlauf keinen signifikanten Unterschied zwischen nicht infiltrierten und GFP (Mock) infiltrierten Pflanzen gab. In den *WRKY33* infiltrierten Pflanzen zeigt sich beginnend ab drei Tagen nach Infiltration eine stetige Reduktion der Sporulation. Am Tag fünf nach der Infiltration erreicht die Resistenz ein Maximum mit einer Reduktion der Sporulation um etwa 70 %. Zusätzlich wurde in den infiltrierten Blättern die Expression von *VvWRKY33* wie auch des Zielgens *VvPR10.1* mittels qPCR gemessen (**Abbildung 4.16**). Die nicht infiltrierten Kontrollpflanzen zeigten keine signifikante Expression der beiden Gene. Bei den GFP (Mock) infiltrierten Pflanzen war stressbedingt ein leichter Anstieg der Genexpression zu verzeichnen. In den *WRKY33* infiltrierten Pflanzen zeigte sich, dass zunächst das Transgen *VvWRKY33* bis zu 30-fach exprimiert (**Abbildung 4.16**, schwarze Balken) und anschließend das endogene Zielgen *VvPR10.1* bis zu 90-fach induziert wurden (**Abbildung 4.16**, graue Balken).



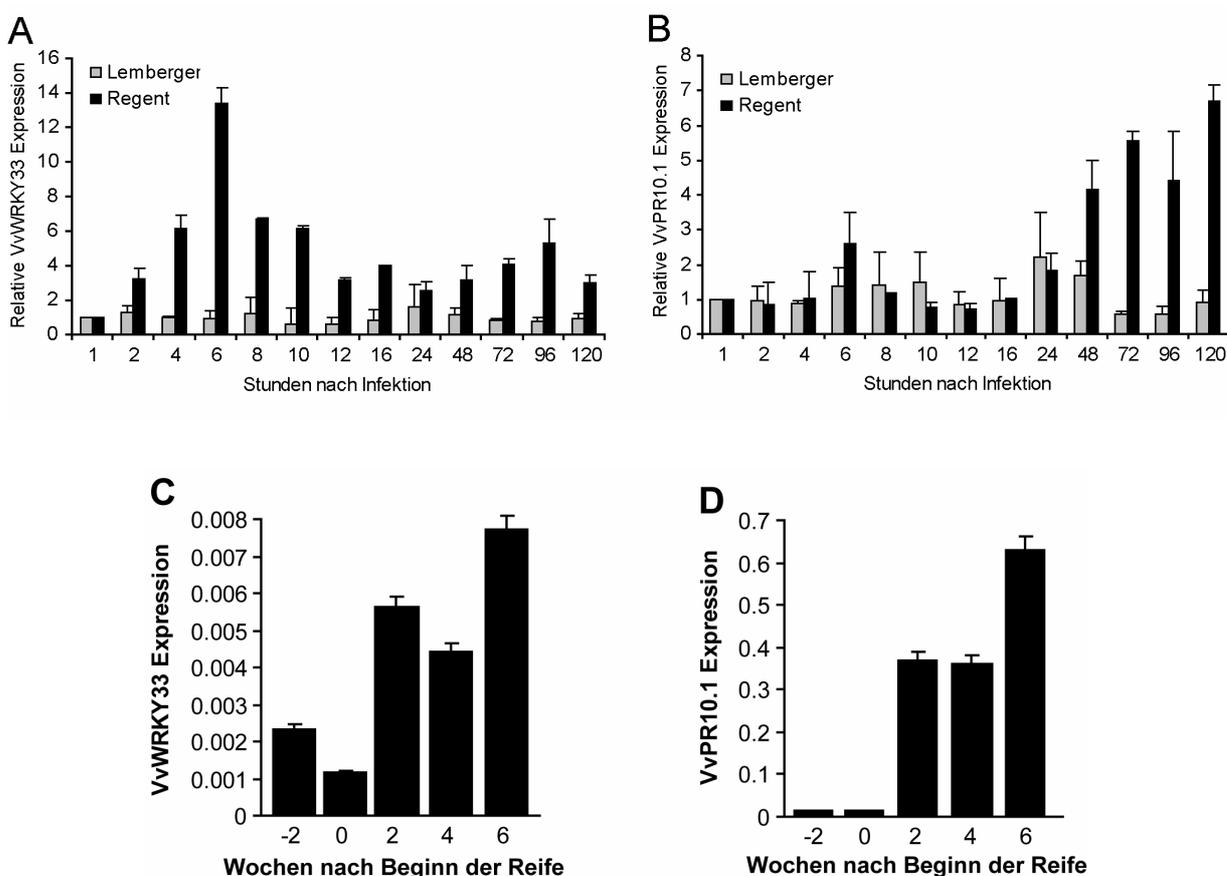
**Abbildung 4.16:** mRNA Expressionsprofil von *VvWRKY33* und *VvPR10.1* in infiltrierten Weinreben (Merz et al., 2014).

Zehn Wochen alte *Vitis vinifera* cv. 'Shiraz' Pflanzen wurden mittels Agrobakterien-vermittelter Vakuuminfiltration mit den angegebenen Genen transformiert und die Blätter zwischen null bis sechs Tagen nach Infiltration zur Isolation der RNA aufgeschlossen. Die Genexpressionen wurden mittels qPCR über genspezifische Primer bestimmt und gegen das Haushaltsgen *VvUbiquitin1* normalisiert. Balken repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 6 individuellen Pflanzen mit Angabe der Standardabweichung. Kontrolle, nicht infiltrierte Kontrollpflanzen; GFP, GFP (Mock) infiltrierte Pflanzen; WRKY33, *VvWRKY33* infiltrierte Pflanzen.

Mittels der Zeitreihe konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Expression von *VvWRKY33* nach Infiltration von Tag 1 bis Tag 4 nach Infiltration kontinuierlich anstieg und nachfolgend eine Erhöhung der *VvPR10.1* Expression in den Pflanzen bis zum Tag 4 nach Infiltration messbar war. Dies führte zur kontinuierlichen Verbesserung der Resistenz gegen *P. viticola*. Auf Grund des hohen Potentials zur Steigerung der Resistenz wurde *VvWRKY33* noch genauer untersucht.

### 4.2.3.2 Untersuchung der *VvWRKY33* Expression in infiziertem Blattgewebe und gesunden Beeren

Um die Relevanz von *VvWRKY33* für die Weinrebe und die Beerenentwicklung *in vivo* näher zu untersuchen, wurde zuerst ein Zeitprofil der Genexpression von *VvWRKY33* und seinem Zielgen *VvPR10.1* in den Rebsorten 'Lemberger' und 'Regent' nach Infektion mit Falschem Mehltau über qPCR ermittelt (Abbildung 4.17A,B). Anschließend wurde die Expression während der Beerenentwicklung der Rebsorte 'Pinot noir' untersucht (Abbildung 4.17C,D).



**Abbildung 4.17: Expression von *VvWRKY33* und *VvPR10.1* während der Infektion mit Falschem Mehltau und der Beerenentwicklung** (Merz et al., 2014).

(A,B) Zeitliches Profil der Transkriptmenge von (A) *VvWRKY33* und (B) *VvPR10.1* wurde mittels qPCR unter Verwendung genspezifischer Primer in Weinrebenblättern zu den angegebenen Stunden nach Infektion bestimmt. Expressionswerte wurden korrigiert durch das Haushaltsgen *VvUbiquitin1* (TC32075) und normalisiert zur nicht infizierten Kontrolle (Mock Infektion). Die Balken zeigen die Messwerte von drei unabhängigen qPCR Replikaten mit Angabe der Standardabweichung.

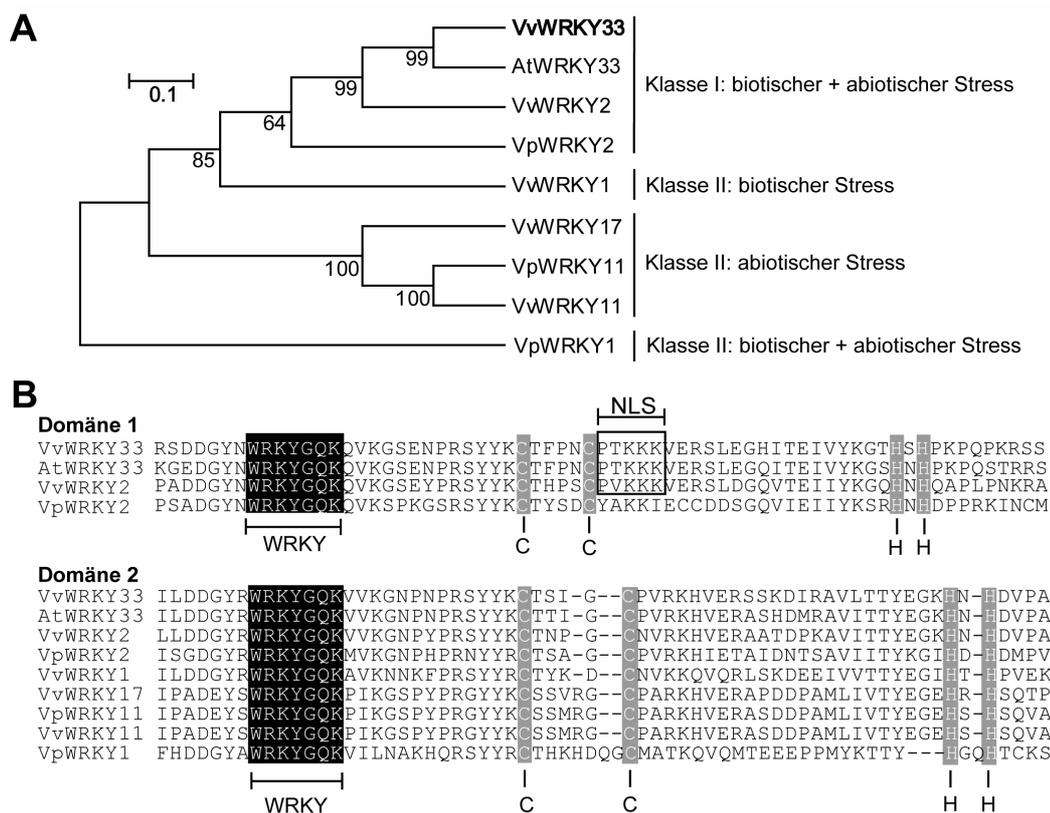
(C,D) Transkriptmenge von (C) *VvWRKY33* und (D) *VvPR10.1* wurde mittels qPCR unter Verwendung genspezifischer Primer bestimmt und zum Haushaltsgen *VvUbiquitin1* (TC32075) normalisiert. Die x-Werte zeigen die Anzahl an Wochen nach Beginn der Reife in Beerenhaut von *Vitis vinifera* cv. 'Pinot noir'. Die Balken zeigen die Messwerte von drei unabhängigen qPCR Replikaten mit Angabe der Standardabweichung.

Hierbei zeigte sich für *VvWRKY33* eine fast 14-fache Induktion durch die Infektion bereits nach sechs Stunden in der resistenten Rebsorte 'Regent'. Im anfälligen 'Lemberger' hingegen konnte keine Induktion über den gesamten Zeitraum gemessen werden (**Abbildung 4.17A**). Das Zielgen *VvPR10.1* zeigte eine biphasische Induktion mit einer knapp dreifachen Expression bereits nach sechs Stunden und einer spezifischen Induktion ab 48 Stunden nach Infektion in der resistenten Rebsorte 'Regent'. Auch hier scheint die Induzierbarkeit in der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' stark unterdrückt zu sein. (**Abbildung 4.17B**). Während der Entwicklung der Beeren ließ sich mit Beginn der Beerenreife (Véraison) eine sechs- bis achtfache Induktion von *VvWRKY33* nachweisen (**Abbildung 4.17C**). Zeitgleich fand auch eine 40- bis 60-fache Expression des Zielgens *VvPR10.1* statt (**Abbildung 4.17D**).

Alles in allem zeigten die Ergebnisse, dass *VvWRKY33* und damit auch sein Zielgen *VvPR10.1* in der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' durch Pathogenbefall nicht induziert wurden. In der resistenten Rebsorte 'Regent' hingegen konnte eine frühe Expression des *VvWRKY33* mit anschließender Induktion des Zielgens *VvPR10.1* nachgewiesen werden. In den Beeren zeigte sich eine entwicklungsabhängige Expression der beiden Gene beginnend mit der Beerenreife (Véraison).

#### 4.2.3.3 Phylogenetische Sequenzanalyse des Transkriptionsfaktors *VvWRKY33*

Zur Einordnung des *VvWRKY33* TF in die bereits publizierten WRKY TFs aus der Weinrebe und zur Identifizierung des nächsten Homologs aus *Arabidopsis* wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt. Hierzu wurde zunächst ein Alignment der WRKY Proteine vorgenommen und auf Grundlage der gesamten Proteinlänge ein Stammbaum erstellt (**Abbildung 4.18A**). Es lässt sich erkennen, dass *VvWRKY33* zusammen mit *AtWRKY33* eine eigene Gruppe bildet. Diese beiden Faktoren weisen eine Homologie von über 80 % über die gesamte Proteinlänge auf. Die beiden WRKY Domänen zeigen sogar eine Homologie von über 90 % (**Abbildung 4.18B**). Die wenigen bereits charakterisierten WRKY TFs aus Wein wurden ebenfalls in die Analyse mit einbezogen. *AtWRKY33*, *VvWRKY2* und *VpWRKY2* gehören zur Klasse I und wurden für ihre Funktion bei biotischem und abiotischem Stress beschrieben (Zheng et al., 2007; Mzid et al., 2007; Li et al., 2010). *VvWRKY1* gehört zur Klasse II und wurde nur unter biotischem Stress charakterisiert (Marchive et al., 2007). *VvWRKY17*, *VvWRKY11*, *VpWRKY11* gehören auch zur Klasse II und wurden nur für abiotischen Stress beschrieben (Liu et al., 2009; Liu et al., 2011; Yu et al., 2013). *VpWRKY1* gehört ebenfalls zur Klasse II und wurde für biotischen und abiotischen Stress beschrieben (Li et al., 2010).



**Abbildung 4.18: Phylogenetischer Sequenzvergleich von publizierten WRKY Proteinen in der NCBI Datenbank (nach Merz et al., 2014).**

Alignments wurden mit Clustal Omega unter Verwendung der voreingestellten Parameter durchgeführt.

(A) Der Stammbaum wurde mittels MEGA5 Software erstellt. Inventarnummern der verwendeten WRKY Proteine: VvWRKY33, XP\_002264974.1 (KF800706); AtWRKY33, ASM34736.1; VvWRKY2, AST46067; VpWRKY2, ADD70008; VvWRKY1, AST90397; VvWRKY17, ACY25182; VpWRKY11, AFV70622; VvWRKY11, ACY25182; VpWRKY1, ACY69975; Der Maßstabsbalken repräsentiert 0,1 Substitutionen pro Seite und die Bootstrapwerte basierend auf 1000 Replikaten sind an den Knotenpunkten angegeben.

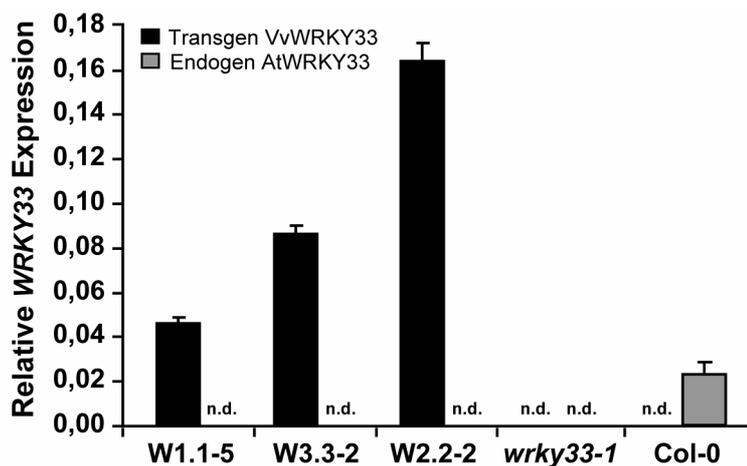
(B) Alignments der Aminosäuresequenzen von WRKY Proteinen der Klasse I und II mit zwei bzw. einer WRKY Domäne. Lücken (Striche) wurde für die Optimierung des Alignments eingefügt. Die hochkonservierte W-Box ist mit einer schwarzen Box und die potentiellen Zink Finger Liganden Motive (C-X4-C-X22-H-X1-H) mit einer grauen Box hervorgehoben. NLS, Kernlokalisierungssignal.

Die phylogenetische Sequenzanalyse von VvWRKY33 zeigte eine hohe Homologie zum bereits charakterisierten TF AtWRKY33. Die WRKY Domänen der bereits beschriebenen TF aus der Weinrebe wiesen eine hohe Konservierung auf. Außerhalb der WRKY Domänen zeigte sich aber eine sehr große Varianz zwischen den einzelnen WRKY TFs.

#### 4.2.4 Funktioneller Nachweis von VvWRKY33 in Arabidopsis gegen Infektion mit *Hyaloperonospora arabidopsidis* und *Botrytis cinerea*

Auf Grund der hohen Homologie von VvWRKY33 zu AtWRKY33 wurden zum zusätzlichen funktionellen Nachweis, neben der transienten Expressionssystem in der Weinrebe, *A. thaliana wrky33-1* knock-out Mutanten stabil über die Floral-Dip Methode mit VvWRKY33 transformiert um eine funktionelle Komplementierung zu erreichen. Die Resistenzantwort auf die Infektion mit Grauschimmel (*Botrytis cinerea*) (Abbildung 4.20C) und Falschem Mehltau (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) (Abbildung 4.20D) wurde anschließend untersucht.

Es wurden drei transgene Linien mit geringer, mittlerer und hoher Expression des Transgens VvWRKY33 in der qPCR selektiert (Abbildung 4.19). Die Expression wurden im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (Elternlinie) und der *wrky33-1* Mutante analysiert.

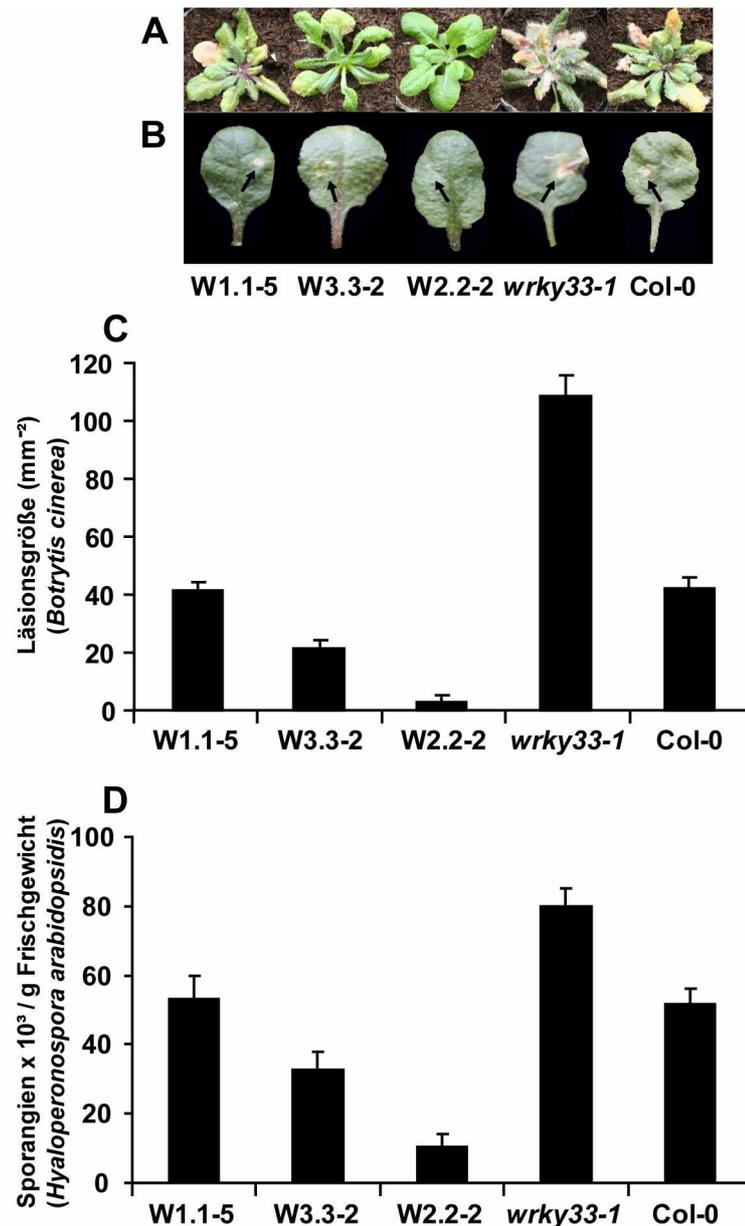


**Abbildung 4.19: Relative Genexpression der komplementierten *Arabidopsis thaliana wrky33-1* knock-out Mutante** (nach Merz et al., 2014).

Die mRNA Level von WRKY33 (transgen und endogen) wurden mittels qPCR unter Verwendung genspezifischer Primer gemessen und normalisiert zum Haushaltsgen *AtActin*.

W1/2/3, unabhängige komplementierte *wrky33-1* Linien welche 35S:VvWRKY33 überexprimieren; Col-0, anfälliger Wildtyp; *wrky33-1*, hoch anfällige knock-out Mutante, n.d. nicht detektierbar

Die *wrky33-1* Mutante zeigte im Vergleich zu Col-0 eine erhöhte Anfälligkeit gegen Falschen Mehltau (Abbildung 4.19) und Grauschimmel (Abbildung 4.20C). Die transgene Linie W1.1-5 zeigte eine vergleichbare WRKY33 Expression wie der Wildtyp Col-0 und konnte die Resistenz des Wildtyps wiederherstellen. Die beiden stärker exprimierenden transgenen Linien zeigten sogar eine deutliche Verbesserung der Resistenz als im Wildtyp Col-0. Die hohe Expression von VvWRKY33 in der Linie W2.2-2 führt sogar dazu, dass nur noch minimale Anzeichen einer Infektion sowohl bei Falschem Mehltau wie auch Botrytis erkennbar waren (Abbildung 4.20A,B).



**Abbildung 4.20: Komplementierung der *Arabidopsis thaliana* *wrky33-1* knock-out Mutante mit anschließender Pathogeninfektion** (teilweise in Merz et al., 2014).

*VvWRKY33* spielt eine Rolle als positiver Regulator der Resistenz in *Arabidopsis*.

(A) Pflanzen wurden mit *B. cinerea* durch Besprühen inokuliert und der Befall nach 7 Tagen beobachtet.

(B) Abgelöste Blätter von 4 Wochen alten Pflanzen wurden mit Einzeltropfen einer 250.000 Sporangien/ml *B. cinerea* Suspension infiziert. Bilder zeigen repräsentative Läsionen nach 5 Tagen.

(C) Läsionsgröße nach *B. cinerea* Infektion wurde mit der ImageJ Software analysiert. Balken zeigen Mittelwerte von 60 verschiedenen Blättern von 20 verschiedenen Pflanzen mit Standardabweichung.

(D) Zwei Wochen alte *A. thaliana* Pflanzen wurden mit einer 250.000 Sporangien/ml *H. arabidopsidis* Suspension besprüht. Sieben Tage nach Inokulation wurden die Sporangien von 50 Pflanzen heruntergewaschen und mittels Hämozytometers ausgezählt. Die Anzahl Sporangien wurde pro g Blattmaterial berechnet. Balken repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 50 Pflanzen mit Angabe der Standardabweichung.

Col-0, anfälliger Wildtyp; *wrky33-1*, knock-out Mutante; W1/2/3, unabhängige komplementierte *wrky33-1* Linien welche 35S:*VvWRKY33* überexprimieren; *wrky33-1*, hoch anfällige knock-out Mutante.

Alles in allem konnte durch die Komplementierung der *wrky33-1* knock-out Mutante mit *VvWRKY33* der Phänotyp des Wildtyps Col-0 bei der Infektion mit *H. arabidopsidis* und *B. cinerea* wiederhergestellt werden. In zwei transgenen Linien, welche eine stärkere Expression von *VvWRKY33* aufwiesen, konnte sogar einer Verbesserung der Resistenz erreicht werden, wodurch nur noch vereinzelte Anzeichen einer Infektion zu erkennen waren.

## 5 Diskussion

Die steigende Nachfrage nach resistenten Rebsorten (*Vitis vinifera* ssp. *vinifera*) mit ausgeprägter Resistenz gegen eine Vielzahl verschiedener Pathogene wie den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) und den Echten Mehltau (*Erysiphe necator*), auf Grund des immer weiter steigenden Pathogenbefalls, beschäftigt viele Züchter (Iacono et al., 2013). Die meisten Forschungsprojekte zielen auf die Kartierung und Pyramidisierung (Kombination verschiedener Resistenzregionen in einem Genotyp) von Regionen eines quantitativen Merkmals (QTL - quantitative trait loci), welche über genomweite Assoziationsstudien ermittelt wurden (Fischer et al., 2004; Eibach et al., 2007; Riaz et al., 2011). Die eigentliche Ursache für die Resistenz, also die Resistenzgene selbst, bleiben bei der Anwendung der Kartierung und Pyramidisierung weitestgehend unerforscht.

In dieser Arbeit sollte daher ein Beitrag zur Erforschung der Resistenzmechanismen in Weinreben zur zukünftigen Verbesserung der Züchtung neuer resistenter Sorten geleistet werden. Es wurden hierfür Rezeptoren zu Pathogenerkennung und Transkriptionsfaktoren auf ihre funktionelle Relevanz in der Abwehr der Weinrebe gegen den Falschen Mehltau hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des *VRP1-3* Rezeptors und der TFs *VvWRKY33* sowie *VvERF5* und ihres potentiellen Zielgens *VvPR10.1* in anfälligen Rebsorten zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber dem Falschen Mehltau führten.

### 5.1 Beteiligung der *VRP1* Rezeptoren an der Resistenz gegen *Plasmopara viticola*

Die Beteiligung der *VRP1* Rezeptoren an der Resistenz gegen den Falschen Mehltau konnte mittels Agrobakterien-vermittelter Vakuuminfiltration sowohl in der Weinrebe, als über Floral-Dip auch in Arabidopsis gezeigt werden. Die transiente Transformation von *VRP1-1* und *VRP1-2* in Weinrebenblättern konnte die Resistenz der Pflanzen gegen den Falschen Mehltau (*P. viticola*) um etwa 10 % steigern und die transiente Transformation von *VRP1-3* bewirkte sogar eine Reduktion der Sporulationsrate um gute 50 % (**Abbildung 4.9**). Die stabile Transformation der *VRP1* Gene in Arabidopsis zeigte keine phänotypischen Auswirkungen. Die ektopische Expression von *VRP1-1* und *VRP1-2* bewirkte hier nur eine minimale Resistenzsteigerung, wohingegen die Expression von *VRP1-3* die Resistenz gegen den Falschen Mehltau (*H. arabidopsidis*) sogar um 70 % steigern konnte (**Abbildung 4.11**).

### 5.1.1 Die *in silico* Analyse der VRP1 Rezeptoren zeigt charakteristische Elemente für CC<sub>R</sub>-NBS-LRR Resistenzproteine auf

Die vergleichende bioinformatische Analyse der VRP1 Rezeptoren aus der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' und der resistenten Rebsorte 'Regent' zeigte keinen Unterschied in der Primärstruktur der Proteine zwischen den beiden Rebsorten. Obwohl jeweils zehn verschiedene Klone sequenziert wurden, konnte die Existenz eines zweiten Allels für die beiden Rebsorten nicht ausgeschlossen werden. Die Homologie der drei *VRP1* Gene untereinander lag bei über 80 %. *VRP1-1* unterschied sich auf genomischer DNA Ebene von *VRP1-2* und *VRP1-3*, da hier ein verlängertes Intron 1 sowie ein zusätzliches Exon vorhergesagt wurden (**Abbildung 4.1**). Auf Grund ihrer typischen CC-NBS-LRR (Coiled Coil - Nucleotide Binding Site - Leucine Rich Repeat) Struktur ähneln alle drei VRP1 Proteine einer Vielzahl von möglichen NBS-LRR Resistenzproteinen. Die beiden nächsten charakterisierten Homologe sind das Tabak Mosaikvirus Resistenzgen *NRG1* (*N requirement gene 1*, Peart et al., 2005) aus *Nicotiana benthamiana* (Tabak) mit 40 % Homologie und das Arabidopsis Genprodukt von *ADRI* (*activated disease resistance*), welches eine Resistenz gegen *Peronospora parasitica* und *Erysiphe cichoracearum* vermittelt, mit 31 % Homologie (Grant et al., 2003). Das *NbNRG1* Gen genauso wie andere homologe Pflanzenresistenzgene zu *VRP1* kodieren ebenso die Unterklasse der CC-NBS-LRR typischen Resistenzproteine (Dangl und Jones 2001; Meyers et al., 2003). Der größte Unterschied lag bei *VRP1-1* und *VRP1-2* in der Vorhersage einer Domäne mit hoher Homologie zu den RPW8 Proteinen aus Arabidopsis. Für die Proteine RPW8.1 und RPW8.2 aus Arabidopsis wurde gezeigt, dass diese eine allgemeine breite Resistenz gegen verschiedene Pathogene hervorrufen (Xiao et al., 2001). Diese Domäne wurde im *VRP1-3* nur mit sehr schwacher Übereinstimmung detektiert und daher als nicht vorhanden angesehen (**Abbildung 4.2**). Nach Collier et al., (2011) werden jene chimären Resistenzproteine als CC<sub>R</sub>-NB-LRR Proteine bezeichnet und deren Vorhandensein wird in allen höheren Pflanzen auf Grund von phylogenetischen Untersuchungen postuliert. Es konnte gezeigt werden, dass beispielsweise für *NbNRG1* und *AtADRI* der N-terminale Bereich (CC<sub>R</sub>), mit hoher Homologie zu den *RPW8* Genen aus Arabidopsis, alleine im Vergleich zu den N-terminalen Bereichen von anderen Resistenzgenen (CC) bereits eine Resistenz hervorrufen kann. Dies konnte durch transiente Transformation einer Vielzahl von CC und CC<sub>R</sub> Domänen in Tabak gezeigt werden, da die Transformation der CC<sub>R</sub> Domänen alleine bereits eine Hypersensitivitätsreaktion (HR) in Tabak (*N. tabacum*) hervorriefen (Collier et al., 2011).

Im Weingenom sind bislang 233 Kopien von NBS-LRR Proteinen identifiziert worden (Velasco et al., 2007). Von den NBS-LRR Proteinen wird im Allgemeinen angenommen, dass sie an der Erkennung spezifischer Pathogeneffektoren, den sogenannten Avirulenzproteinen (Avr), beteiligt seien und die Abwehrantwort initiieren könnten (Ellis et al., 2000; DeYoung et al., 2006; Joshi et al., 2011). Es wurden Aminosäuresequenzen in den NBS Regionen der VRP1 Peptide entdeckt, die einzigartig für die CC-NBS-LRR Klasse der Resistenzproteine sind (Pan et al., 2000). Aufgrund der

charakteristischen Motive in den Proteinsequenzanalysen konnte außerdem eindeutig die Zugehörigkeit von zwei der drei VRP1 Rezeptoren zur Gruppe der CC<sub>R</sub>-NBS-LRR Proteine bestimmt werden. Die CC<sub>R</sub>-NB-LRR Untergruppe wurde zuvor in verschiedenen Arbeiten unterschiedlich bezeichnet (nicht-TIR N4 oder CNL-A) und scheint einer der Vorfahren der Haupt CC-NBS-LRR monophyletischen Gruppe zu sein (Cannon et al., 2002; McHale et al., 2006; Meyers et al., 2003). Nur vereinzelte CC<sub>R</sub>-NB-LRR Proteine wurden bis heute kloniert und funktionell charakterisiert obwohl diese sich durch ihre charakteristischen Motive ganz klar von anderen NB-LRR Proteinen unterscheiden (Chini und Loake, 2005). Die am Besten untersuchten Mitglieder dieser Gruppe stellen NbNRG1 (Peart et al. 2005) und AtADR1 (Grant et al., 2003; Chini et al., 2004) dar. Interessanterweise wurde weder für NRG1 noch für ADR1 beschrieben, dass diese in klassischer Gen-für-Gen Abwehrweise, welche für Resistenzproteine charakteristisch ist, wirken (Collier et al., 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine klare Zuordnung der VRP1 Proteine zu den CC-NBS-LRR Resistenzproteinen auf Grund charakteristischer Domänen durchgeführt werden. VRP1-1 und VRP1-2 verfügten über große Ähnlichkeit zur Klasse der CC<sub>R</sub>-NBS-LRR Proteine, wohingegen VRP1-3 eine größere Ähnlichkeit zu den verbreiteteren CC-NBS-LRR Proteinen aufwies. Die bioinformatische Analyse der VRP1 Proteine zeigte, dass diese zwischen dem anfälligen 'Lemberger' und dem resistenten 'Regent' konserviert zu sein schienen. Zudem wurde eine über 80 %-ige Homologie der drei VRP1 Proteine untereinander festgestellt. Die Ähnlichkeit zu dieser Klasse der Resistenzproteine ließ eine Funktion während der induzierten Resistenz (ETI) wie sie bereits für NbNRG1 (Peart et al. 2005) und AtADR1 (Grant et al., 2003) beschrieben wurden, vermuten.

### **5.1.2 Subzelluläre Lokalisation von VRP1:GFP zeigte einen intrazellulären Rezeptor im Cytoplasma**

In Pflanzen fungieren Resistenzproteine vom Typ NBS-LRR meist als intrazelluläre oder Transmembran-Rezeptoren, welche Effektorproteine von Pathogenen entweder direkt oder indirekt über die Erkennung von Effektor-induzierten Modifikationen anderer pflanzeigener Proteine erkennen. Die Aktivierung der Resistenzproteine kann eine ganze Bandbreite an Abwehrmechanismen zur Folge haben, deren genaue molekulare Mechanismen zur Aktivierung und Übersetzung in die entsprechenden Abwehrreaktionen aber bislang nicht bekannt ist (Qi et al., 2013).

Die subzelluläre Lokalisation der chimären VRP1 Resistenzproteine die eine Fusion der allgemeinen Resistenz (PTI) in Form der RPW8 Domäne mit der spezifischen Resistenz (ETI) in Form der CC-NBS-LRR Domänen darstellen, könnte weiteren Aufschluss über die tatsächliche Funktion liefern. Die subzelluläre Lokalisation eines Proteins konnte als eng verwandt mit seiner biologischen Funktion gezeigt werden (Jensen et al. 2002). Für die RPW8 Proteine aus Arabidopsis wurde eine

cytoplasmatische Lokalisation aufgezeigt (Xiao et al., 2001). Die CC-NBS-LRR Proteine sind in ihrer Funktion als Rezeptoren häufig mit der Plasmamembran assoziiert um eindringende Pathogene bereits an der Außenseite der Plasmamembran zu detektieren (Elmore et al., 2013). Zur Vorhersage der Lokalisierung wurden zunächst verschiedene Algorithmen verwendet, welche auf Grundlage von Datenbanken und Sequenzvergleichen Prognosen über mögliche charakteristische Motive abgeben und damit Rückschlüsse auf die Lokalisation ziehen.

Durch die Verwendung von Algorithmen und verschiedenen Datenbanken wurde eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Lokalisierung aller drei VRP1 Proteine im Cytosol vorhergesagt (**Tabelle 4.1**). Da aber zusätzlich auch ein Signalpeptid und Transmembranbereiche identifiziert wurden, ließ sich eine Assoziation zum Endomembransystem nicht ausschließen.

Da die bioinformatische Analyse der VRP1 Rezeptoren keine abschließende Auskunft über die subzelluläre Lokalisation der VRP1 Proteine geben konnte, wurde die Lokalisation näher untersucht. Hierzu wurden zunächst N- und C-terminale GFP Fusionen an VRP1 kloniert und die GFP Fluoreszenzsignale mittels des konfokalen Mikroskops detektiert. Hierbei ließen sich nur für die C-terminalen Fusionsproteine GFP Fluoreszenzsignale detektieren. Wie bereits bei Palmer und Freeman (2004) gezeigt ist zu vermuten, dass die N-terminale Markierung von Proteinen mit GFP die Proteinlokalisierung und Proteinfaltung nachteilig beeinflusst, wohingegen die C-terminale GFP Markierung die Lokalisierung des nativen Proteins selten stört. Nur die C-terminalen Fusionskonstrukte wurden daher zur Lokalisation in Weinreben Protoplasten nach Transformation durch Elektroporation verwendet. Es wurde eine Cotransformation zusammen mit dem TM23-RFP Marker für die Plasmamembran (Brandizzi et al., 2002) oder dem mRFP1-Marker für das Cytosol (Campbell et al., 2002) durchgeführt. Alle drei VRP1:GFP Fusionsproteine zeigten eine klare Übereinstimmung mit dem mRFP1-Marker im Cytosol der Protoplasten (**Abbildung 4.3**), wodurch eine Lokalisation aller drei VRP1 Proteine im Cytoplasma gefolgert werden konnte.

Durch aktuelle Forschungsprojekte wird immer klarer, dass NBS-LRR Proteine aus Pflanzen gezielt zu bestimmten subzellulären Kompartimenten transportiert werden können in Abhängigkeit davon, wo die Effektoren detektieren wurden oder detektiert werden sollen. Zusätzlich wird beschrieben, dass einige NBS-LRR Proteine nach der Erkennung der Effektoren relokalisieren können, was die Unterschiede in den Stoffwechselwegen widerspiegeln könnte (Qi et al., 2013). Neueste Versuche zu den RPW8 Proteinen aus Arabidopsis zeigten ebenfalls, dass RPW8.2 nach Infektion gezielt zur extrahaustoriellen Membran (EHM) des eindringenden Pathogens transportiert wird und dort spezifisch die Abwehrreaktion initiiert (Wang et al., 2009). Es konnte sogar eine spezifische Sequenz von 60 Aminosäuren identifiziert werden, die für die Relokalisierung essentiell ist und somit die Existenz eines EHM-orientierten Membrantransportsystems in Epidermiszellen von Arabidopsis Blättern, welche mit Echtem Mehltau befallen waren, beweisen (Wang et al., 2013). Auf Grund dieser

Ergebnisse soll in weiterführenden Versuchen untersucht werden, ob eine Relokalisierung der VRP1 Proteine nach Befall mit Falschem Mehltau gezeigt werden kann.

Durch die transiente Transformation von VRP1:GFP Fusionsproteinen zusammen mit dem mRFP1-Marker für das Cytoplasma in Weinreben Protoplasten konnte mittels konfokaler Mikroskopie eine Lokalisierung für alle drei VRP1 Proteine ohne Pathogeninfektion intrazellulär im Cytoplasma gezeigt werden. Die Möglichkeit der Relokalisierung der VRP1 Proteine soll in weiteren Untersuchungen geprüft werden.

### 5.1.3 Pathogenbefall induziert *VRP1* Expression in der resistenten Rebsorte 'Regent' nicht in 'Lemberger'

In Vorarbeiten wurde nach Infektion der resistenten *Vitis riparia* Selektion 'Gloire de Montpellier' im Vergleich zu der anfälligen Rebsorte 'Riesling' mit *P. viticola* eine differentielle Genexpressionsanalyse durchgeführt. In der Mikroarray Analyse konnte die Rezeptorfamilie *VRP1* als hochreguliert in der resistenten im Vergleich zur anfälligen Rebsorte identifiziert werden (Kortekamp et al., 2008).

In dieser Arbeit wurde die Funktion der *VRP1* Gene für die Abwehr des Falschen Mehltaus untersucht. Hierzu wurde die Genexpression der drei *VRP1* Gene in Blättern von Gewächshauspflanzen der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' im Vergleich zur resistenten Rebsorte 'Regent' nach Infektion mit *P. viticola* zu verschiedenen Zeitpunkten mittels qPCR analysiert. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass alle drei *VRP1* Gene in 'Lemberger' und 'Regent' vorhanden sind und transkribiert werden (**Abbildung 4.4**). In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass anfällige Rebsorten prinzipiell die notwendigen genetischen Information zur Initiierung einer Abwehrreaktion besitzen (Figueiredo et al., 2012). Jedoch scheinen die Perzeption und die Weiterleitung mittels der Signaltransduktionsketten zwischen den Sorten zu variieren und somit in anfälligen Rebsorten nicht in adäquater Weise die Abwehrmechanismen zu aktivieren, um eindringende Pathogene abzuwehren. Eine weitere Möglichkeit wäre die gezielte Blockierung der Abwehrmechanismen durch das eindringende Pathogen. Hinzu kommt, dass die Erhöhung des basalen Levels von Genen die in die Abwehrreaktionen involviert sind, wie die PAL, Proteasen und Transkriptionsfaktoren in resistenten Rebsorten wie *V. vinifera* cv. 'Regent' nahe legt, dass diese Rebsorten eine höhere Fähigkeiten aufweisen, Infektionen durch Pathogene abzuwehren (Figueiredo et al., 2008).

Dies führt zu der Hypothese, dass resistente Rebsorten wie 'Regent' in der Lage seien die Abwehrreaktionen schneller und stärker zu induzieren (Figueiredo et al., 2008). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte gezeigt werden, dass die Induktion von *VRP1-1* zwar in beiden Rebsorten nicht nachgewiesen werden konnte, aber dafür eine unterschiedliche Expression von *VRP1-2* und/oder *VRP1-3* (*VRP1-2/3*). Diese beiden Gene konnten mittels qPCR nicht verlässlich voneinander unterschieden werden. Es konnte keine Induktion der *VRP1-2/3* Expression in der

anfälligen Rebsorte 'Lemberger' während der gesamten Infektionsdauer nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte bereits vier Stunden nach Infektion (hpi) in der resistenten Rebsorte 'Regent' eine zweifache Induktion detektiert werden, welche zehn und 24 hpi zwei lokale Maxima mit einer vierfachen und einer sechsfachen Induktion erreichte (**Abbildung 4.4**). Es konnte somit eine schnelle und starke Induktion der *VRP1* Resistenzgene nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte eine Induktion von mindestens zwei der drei *VRP1* Gene auch nach Infektion mit Echtem Mehltau (*Erysiphe necator*) im resistenten 'Regent' im Vergleich zum anfälligen 'Lemberger' detektiert werden (Zyprian et al., unpubliziert).

Die Infektionsanalyse offenbarte eine veränderte Expression der *VRP1* Gene im zeitlichen Verlauf nach der Infektion. Ein klarer Unterschied in der Expressionsstärke und Geschwindigkeit der Induzierbarkeit deuten an, dass die *VRP1* Resistenzgene einen essenziellen Unterschied zwischen der resistenten Rebsorte 'Regent' und der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' bei der Pathogenwahrnehmung und Signaltransduktion spielen könnten

#### **5.1.4 Transiente Expression der VRP1 Rezeptoren in Weinrebenblättern verbessert die Resistenz gegen *P. viticola***

Zum funktionellen Nachweis der VRP1 Rezeptoren wurde zunächst ein transientes homologes Expressionssystem über Agrobakterien-vermittelte Vakuuminfiltration in Blättern von Gewächshausreben verwendet. Zusätzlich wurde anschließend ein stabiles heterologes Expressionssystem über Floral-Dip Transformation der *VRP1* Gene in anfällige Arabidopsis Pflanzen verwendet. Auch wenn in Arabidopsis Optimierungsmöglichkeiten für die Agrobakterien-vermittelte Infiltration bestehen, ist ein Ausbleiben der Expression des Transgens in den transgenen Pflanzen selten. Transformationseffizienzen von 80-90 % sind üblich (Kim et al., 2009). Ähnlich verhält es sich bei Tabak. Auch hier lassen sich problemlos reproduzierbare Transformationseffizienzen von 80-90 % erreichen (Sparkes et al., 2006). Die transiente Expression von Genen zur funktionellen Analyse in Weinreben ist allerdings deutlich komplexer als die Expression in Arabidopsis oder Tabak. Die publizierten Agroinfiltrationssysteme in Weinreben verwenden immer *in vitro* Pflanzen für die Expression von *GFP* und *GUS* Reportergenen oder anderen Fluoreszenzmarkern (Santos-Rosa et al., 2008; Zottini et al., 2008). Vorversuche mit *in vitro* Pflanzen haben allerdings gezeigt, dass diese sehr sensitiv auf die Überexpression von TFs mittels 35S Promotor reagieren. Eine Stressreaktion führte dazu, dass in den Pflanzen eine sehr große Anzahl an Genen hochreguliert wurde und somit die Untersuchung der Auswirkungen des Transgens nicht möglich waren. Zusätzlich wurden in vielen Pflanzen Hypersensitivitätsreaktionen ausgelöst, die zum Absterben der Pflanzen führten. Da aber die stabile Transformation von Weinreben bis zu zwei Jahre dauern kann (Carimi et al., 2005) musste für die Versuche zunächst die Agrobakterien-vermittelte Vakuuminfiltration von Gewächshausreben

optimiert werden. Für *VRP1-1* und *VRP1-2* zeigte sich schließlich eine Reduktion der Sporulation von *P. viticola* um etwa 10 %. Für *VRP1-3* hingegen konnte die Resistenz um etwa 50 % verbessert werden (**Abbildung 4.9**).

Die funktionellen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten mittels transienter Transformation der *VRP1* Gene in Weinrebenblättern und anschließendem Pathogenassay, dass die *VRP1* Gene an der Resistenz gegen *P. viticola* beteiligt sind. Da die *VRP1* Proteine aus 'Lemberger' und 'Regent' keinen Sequenzunterschied aufwiesen und die ektopische Expression in der anfälligen Rebsorte 'Shiraz' die Sporulationsrate um 50 % vermindern und somit die Resistenz der Pflanzen signifikant steigern konnte, muss die Ursache für die fehlende Expression in anfälligen Rebsorten also in der Induzierbarkeit oder der Regulation des Rezeptors selbst (upstream) liegen. Dieser Umstand soll in weiterführenden Versuchen mittels Analyse regulativer Promotorsequenzen untersucht werden.

### **5.1.5 Stabile Expression der *VRP1* Rezeptoren in *Arabidopsis* führt zu gesteigerter Resistenz gegen *H. arabidopsidis***

Zusätzlich zum transienten homologen Expressionssystem in der Weinrebe wurde zum funktionellen Nachweis der *VRP1* Rezeptoren eine stabile Expression im heterologen System *Arabidopsis* durchgeführt. Hierzu wurden *Arabidopsis* Pflanzen des anfälligen Wildtyps Col-0 über die Floral-Dip Methode (Clough und Bent, 2008) stabil mit den *VRP1* Konstrukten transformiert. Die Pflanzen der T<sub>2</sub>-Generation zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp und wurden für die Infektion mit *H. arabidopsidis* verwendet (**Abbildung 4.10**). Die Überexpression der *VRP1* Gene in den 35S::Vv*VRP1* transgenen *Arabidopsis* Pflanzen relativ zum Col-0 Wildtyp wurde vor der Infektion mittels qPCR kontrolliert. Die Transformation mit *VRP1-1* und *VRP1-2* brachte nur eine geringe Verbesserung der Resistenz. Die Expression von *VRP1-3* hingegen konnte die Sporulation von *H. arabidopsidis* um 70 % reduzieren und somit die Resistenz erheblich steigern (**Abbildung 4.11**).

Ähnliche funktionelle Nachweise in *Arabidopsis* wurden auch in anderen Untersuchungen durchgeführt. So konnten die TIR-NBS-LRR Resistenzgene *MbR4* und *MbR7* aus dem Wildapfel (*Malus baccata*) nach Überexpression in *Arabidopsis* die Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 deutlich steigern (Lee et al., 2005; Lee et al., 2007).

Die stabile Transformation der *VRP1* Konstrukte in *Arabidopsis* mit anschließender Infektion mit *H. arabidopsidis* zeigte, dass die Expression von *VRP1-3* eine deutliche Steigerung der Resistenz um etwa 70 % bewirkte. Diese konnte die Ergebnisse zur Funktion von *VRP1-3* gegen den Falschen Mehltau in den transgenen Weinreben bestätigen.

## 5.1.6 Fazit

Bei den *VRP1* Genen handelt es um Resistenzgene vom Typ CC/CC<sub>R</sub>-NBS-LRR, welche als intrazelluläre Rezeptoren im Cytoplasma lokalisiert werden konnten. Die Expression der *VRP1* Gene konnte in der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' und der resistenten Rebsorte 'Regent' nachgewiesen werden. Die spezifische Induktion von *VRP1-2/3* nach Infektion mit *P. viticola* konnte allerdings nur im resistenten 'Regent' gezeigt werden. Da die Überexpression von *VRP1-3* in der anfälligen Rebsorte 'Shiraz' die Resistenz um 50 % steigern konnte, kann eine korrekte Weiterleitung des Signals in der Signaltransduktionskette (downstream) angenommen werden. Die Ursache für die fehlende Expression in anfälligen Rebsorten muss also in der Induzierbarkeit oder der Regulation des Rezeptors (upstream) liegen. Eventuell ist der Rezeptor in anfälligen Rebsorten auch nicht in der Lage nach Erkennung der Effektoren, die Abwehrreaktionen auszulösen. Zur weiteren Klärung sollen in weiterführenden Versuchen die Promotorbereiche der *VRP1* Gene analysiert werden.

## 5.1.7 Ausblick

### 5.1.7.1 Untersuchungen zur unterschiedlichen Regulation der *VRP1* Gene nach Pathogenbefall

Da die vergleichende Analyse der Offenen Leseraster der *VRP1* Gene keine Unterschiede zwischen der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' und der resistenten Rebsorte 'Regent' hervorbrachte, sollen in weiterführenden Versuchen die Ursachen für die unterschiedliche Expression zwischen den Rebsorten näher untersucht werden. Hierfür soll zunächst eine Diversitätsstudie darüber Auskunft geben, wie konserviert die *VRP1* Gene in einer größeren Anzahl von anfälligen und resistenten Rebsorten mit verschiedenen Resistenzhintergründen sind.

Ein weiterer Unterschied zwischen anfälligen und resistenten Rebsorten könnte in der unterschiedlichen Ausgangsmenge bzw. Anhäufung des Proteins liegen. Zur Abklärung der eventuell unterschiedlichen Menge an *VRP1* Protein zwischen anfälligen und resistenten Rebsorten vor und nach der Infektion mit Falschem Mehltau soll mittels Western Blot Analysen in einer größeren Anzahl von Rebsorten die unterschiedliche Metabolitmenge untersucht werden. Hierzu muss zunächst die Produktion eines spezifischen Antikörpers gegen die *VRP1* Proteine in Auftrag gegeben werden. Mit Hilfe der bereits vorhandenen Sequenzdaten können geeignete Peptidbereiche innerhalb der *VRP1* Proteine zur Synthese der Antikörper identifiziert werden.

Eine weitere Möglichkeit für die Unterschiede zwischen anfälligen und resistenten Rebsorten könnte die unterschiedliche Regulation der *VRP1* Gene durch ihre Promotoren darstellen. Um die molekulare

Basis der Genregulation während der Abwehrreaktion zu untersuchen sollen die Promotoren der *VRP1* Gene aus genomischer DNA des anfälligen 'Lemberger' und des resistenten 'Regent' kloniert und analysiert werden. Hierdurch lassen sich mittels des Dualen Luciferase Reportersystems Aussagen über die Hintergrundaktivität der Promotoren treffen. Zusätzlich kann der Einfluss verschiedener Stimuli (wie Phytohormonen und Elizitoren) auf die Promotoren untersucht werden. Dies könnte Aufschluss über die Ursachen der unterschiedlichen Aktivierung der *VRP1* Gene geben.

### **5.1.7.2 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Infektionen auf die subzelluläre Lokalisierung der *VRP1* Gene**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle drei *VRP1* Gene (mit und ohne N-terminaler RPW8 Domäne) im Cytoplasma lokalisiert sind. Neueste Daten aus der Literatur zum *RPW8* Gen aus *Arabidopsis thaliana* lassen vermuten, dass auch die *VRP1* Rezeptoren zunächst im Cytosol lokalisiert sein könnten, um eindringende Avr (Avirulenz) Gene nach Pathogeninfektion zu erkennen und nach dem Ausbilden der ersten Haustorien gezielt transportiert werden könnten, um anschließend mit der Extrahaustoriellen Membran des Pathogens eine Verbindung zu vermitteln (Wang et al., 2013). Eine anschließende Induktion einer Signaltransduktionskette zur Aktivierung der Resistenzantwort lässt sich schlussfolgern.

Diese Relokalisation soll durch Agrobakterien-vermittelte Expression der *VRP1*:GFP Proteine in Gewächshausreben der Rebsorte 'Shiraz' mit anschließender Pathogeninfektion untersucht werden. Hierzu sollen die Haustorien in den infizierten Blättern mittels geeigneter Farbstoffe (z.B. Ethacridinlactat-Monohydrat) angefärbt und mittels eines konfokalen Mikroskops die Lokalisierung der *VRP1*:GFP Konstrukte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation untersucht werden.

Auf Grund der im N-terminalen Bereich vorhandenen RPW8 Domäne aus *Arabidopsis* lässt sich außerdem eine potentielle Funktion in der Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen ableiten. Zur Klärung dieses Umstandes soll die Lokalisierung sowie die *VRP1* Genexpression nach Infektion mit verschiedenen Pathogenen wie dem Echten Mehltau (*Erysiphe necator*), der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) oder dem Grauschimmel (*Botrytis cinerea*) untersucht werden.

Langfristig ist eine stabile Transformation der *VRP1* Gene in Zusammenarbeit mit Günther Buchholz (RLP Agrosience, Neustadt) mit und ohne GFP Markierung in Reben zur genauen Verfolgung des subzellulären Transportes geplant. Mit Hilfe von RNASeq Analysen der transient oder stabil transformierten Weinreben könnten außerdem zusätzlich wichtige Gene der Signaltransduktionskette, die bei der Ausprägung der Resistenz eine Rolle spielen, identifiziert werden.

## 5.2 Transkriptionsfaktoren in der Signaltransduktionskette der Pathogenabwehr in der Weinrebe

In Vorarbeiten wurde zehn Stunden nach Infektion der resistenten Rebsorte 'Regent' im Vergleich zu der anfälligen Rebsorte 'Chardonnay' mit *Erysiphe necator* (Echter Mehltau) eine Mikroarray Analyse durchgeführt, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Hierbei konnten 23 Pilz-induzierte Gene im 'Regent' als mindestens doppelt so hoch induziert als im 'Chardonnay' mittels qPCR bestätigt werden. Hierunter waren auch sieben Transkriptionsfaktoren (TF) aus vier verschiedenen Familien (MYB, WRKY, AP2/ERF und CZF1/ZFAR1) (**Tabelle 4.2**) sowie die Resistenzgene *PR5* und *PR10* (Dissertation L. Welter, 2008). TFs spielen eine entscheidende Rolle in der Abwehrreaktion von Pflanzen. Mitglieder verschiedenster TF-Familien sind an der Modulation des Abwehr Transkriptoms in Pflanzen beteiligt (Eulgem, 2005). Jede dieser TF-Familien interagiert mit spezifischen *cis*-regulativen Elementen, die häufig in den Promotorregionen von Pathogenese-assoziierten (*pathogenesis-related PR*) Genen vorkommen und deren Expression steuern.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Funktion ausgewählter TFs in der Resistenz gegen den Falschen Mehltau konnte mittels Agrobakterien-vermittelter Vakuuminfiltration sowohl in der Weinrebe, als über Floral-Dip auch in Arabidopsis gezeigt werden. *VvWRKY33*, *VvERF5* und *VvCZF1* konnten den Promotor von *VvPR10.1* in einem transienten Dualen Luciferase Reportersystem in Weinreben Suspensionszellen induzieren (**Abbildung 4.13**). Transiente Expression von *VvWRKY33* und *VvERF5* in Weinreben konnte die Resistenz gegen *P. viticola* um bis zu 70 % steigern (**Abbildung 4.14**). Die stabile Expression von *VvWRKY33* in Arabidopsis *wrky33-1* knock-out Mutanten konnte die Resistenz gegen *H. arabidopsidis* und *Botrytis cinerea* wiederherstellen und die Resistenz des Wildtyps Col-0 sogar noch weiter steigern (**Abbildung 4.20**).

### 5.2.1 Der *VvPR10.1* Promotor enthält *cis*-regulative Elemente für verschiedene Transkriptionsfaktoren

Im Rahmen des Kooperationsprojektes wurden alle Promotoren durch den Kooperationspartner am JKI, Siebeldingen amplifiziert und analysiert (Dissertation T. Moser, 2014). Die Vorhersage der *cis*-regulativen Elemente sowie von Enhancer und Repressor Elementen wurde mit Hilfe der PlantCARE Datenbank (Lescot et al., 2002) durchgeführt.

Obwohl es heute einige verlässliche Methoden zur Vorhersage der Protein kodierenden Bereiche (Offene Leserahmen mit Introns und Exons) gibt (Claverie, 1997), ist die Vorhersage der regulatorischen Einheiten (vor allem den Promotoren) immer noch eine herausfordernde Aufgabe (Ohler et al., 2002). Der Promotor stellt die Genomregion dar, die sich nahe dem Transkriptionsstart

befindet und spielt die wichtigste Rolle in der genetischen Regulation (Pedersen et al., 1999). Promotoren erhalten Signale von verschiedensten Quellen und kontrollieren die Initiation der Transkription welche zum Großteil die Expression eines Gens festlegt (Dieterich et al., 2005). Daher ist die Determination des Promotors ein wichtiger Schritt in der Annotation von Genen (Shelenkov et al., 2009).

Die Promotorbereiche können meistens nicht exakt festgelegt werden, sondern nur auf Grund vorhandener regulatorischer Elemente eingegrenzt werden. Wichtige Elemente stellen unter Anderem die Bindestellen für TFs dar. In den in dieser Arbeit untersuchten Promotoren konnte eine Vielzahl an WRKY Bindestellen detektiert werden. WRKYs binden an die W-Box (C/TTGACC/T) die man unter anderem im Promotorbereich des *VvPR10.1* Gens finden kann, welches in dieser Arbeit näher untersucht wurde. Für *VvWRKY1* wurde bereits gezeigt, dass dieser spezifisch an das W-Box Kernmotiv TTGACC binden kann (Marchive et al., 2007). Es konnte ferner gezeigt werden, dass W-Boxen in den Promotorregionen von Arabidopsis Genen, die bei der Pathogenabwehr aktiviert werden, überrepräsentiert sind (Maleck et al., 2010). Zusätzlich konnte Bindestellen für ERFs detektiert werden. AP2/ERF Faktoren binden an Ethylene-responsive Elemente (ERE) repräsentiert durch die GCC-Box oder Elicitor-responsive Elemente (JERE) (Sahle und Pagés, 2003), die mehrfach im Promotorbereich des *VvPR10.1* Gens vorkommen. Die Induktion der ERE Elemente durch die Arabidopsis TFs *AtERF1-5* wurde bereits genauer untersucht (Fujimoto et al., 2000) und die Induktion der JERE Elemente durch *CrORCA1-2* wurde in *Catharantus roseus* beschrieben (Menke et al., 1999). Des Weiteren konnte MYB Bindestellen gefunden werden. MYB TFs können an eine Vielzahl von verschiedenen Motiven binden, wie beispielsweise *PhMYB3* aus *Petunia hybrida* welches an das Motiv (TAAC[C/G]GTT) bindet (Solano et al., 1995), welches auch im Promotor von *VvPR10.1* identifiziert werden konnte.

Auf Grund der Vielzahl gefundener Elemente wurden der *VvPR10.1* Promotor auf 2534 bp eingegrenzt und vergleichend aus 'Lemberger' und 'Regent' amplifiziert (Dissertation T. Moser, 2014). Die hohe Anzahl an TF Bindestellen lässt eine Regulation des Promotors durch die verschiedenen TF Familien MYB, WRKY, ERF und CZF vermuten, was nachfolgend untersucht wurde.

### **5.2.2 VvCZF1, VvERF5 und VvWRKY33 induzieren VvPR10.1**

Die Induktion von TFs in der resistenten Rebsorte 'Regent' durch Infektion mit *P. viticola* legt eine Beteiligung an der Signaltransduktionskette (Downstreaming) nahe, was zu einer Abwehrreaktion führen kann. Das Vorhandensein ihrer korrespondierenden *cis*-regulativen Bindestellen in der Promotorregion des Resistenzgens *VvPR10.1*, welches ebenfalls durch Pathogenbefall hoch induziert worden ist, könnte einen wichtigen Hinweis auf die Beteiligung an der Abwehrkaskade darstellen.

Um die putative Induktion des *VvPR10.1* Promotors durch die TFs zu analysieren, wurde eine Promotor Induktionsanalyse verwendet. Dies wurde mittels transienter Transformation der TFs *VvCZF1*, *VvERF5* und *VvWRKY33* unter Kontrolle des 35S Promotors, zusammen mit dem Gen einer Leuchtkäferluciferase (*Photinus pyralis*) unter Kontrolle des *VvPR10.1* Promotors in der Weinrebe durchgeführt. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass die TFs *VvCZF1*, *VvERF5* und *VvWRKY33* den Promotor von *VvPR10.1* drei- bis sechsfach induzieren konnten (**Abbildung 4.13**).

Es konnte bereits in anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass beispielsweise eine Flagellin-induzierte MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) in *A. thaliana*, die Transkription von Resistenzgenen (PR-Genen) über die WRKY TFs aktivierte (Zhang et al., 2005b). Diese spezifische Induktion kann zur Induktion einer Resistenzantwort führen. Für *VpPR10.2* aus *Vitis pseudoreticulata*, was eine 95 %-ige Homologie zu *VvPR10.1* aufweist, konnte gezeigt werden, dass die transiente Expression in *V. vinifera* Blättern die Resistenz gegen *P. viticola* signifikant steigern konnte (He et al., 2013). Auf Grund des Induktionspotentials der drei TFs für *VvPR10.1* konnte somit die Relevanz in der Abwehr von *P. viticola* vermutet werden. Dies wurde im weiteren Verlauf des Projektes näher untersucht.

### **5.2.2.1 *VvWRKY33* induziert Resistenz gegen *Plasmopara viticola* und *Botrytis cinerea***

TC47186 zeigte eine hohe Homologie zu dem WRKY Transkriptionsfaktor *AtWRKY33* aus Arabidopsis und wurde daher als *VvWRKY33* bezeichnet. WRKY Faktoren lassen sich an Hand der Anzahl an WRKY (WRKYGQK) Domänen mit einer Länge von etwa 60 Aminosäuren in verschiedene Untergruppen einteilen. Zusätzlich verfügen WRKY Faktoren über Zinkfingerdomänen (C-X4-C-X22-H-X1-H) im C-terminalen Bereich. Da *VvWRKY33* jeweils über zwei der genannten Domänen verfügte, konnte er der Gruppe I zugeordnet werden (Eulgem et al., 2000). Für WRKY Proteine wurde gezeigt, dass sie essentielle Komponenten in verschiedenen Signalwegen bei unterschiedlichsten Stressarten sind und *PR* Gene über die Bindung an das W-Box *cis*-Element in den Promotorbereichen induzieren können (Maleck et al. 2000; Yu et al. 2001). Hunderte WRKY Faktoren in verschiedensten Pflanzenspezies wurden bislang für ihre Funktion bei abiotischem und biotischem Stress beschrieben (Devaiah et al. 2007). In der Weinrebe konnten bis heute 59 Mitglieder der WRKY Superfamilie identifiziert werden, von denen nur wenige funktionell charakterisiert werden konnten (Velasco et al. 2007; Zhang et al. 2011). Beispielsweise führte die Überexpression von *VvWRKY1* in Tabak zu einer erhöhten Resistenz gegen verschiedene Pathogene wie den Falschen und Echten Mehltau, was eine Beteiligung in der Abwehrreaktion vermuten ließ (Marchive et al., 2007). Stabil transformierte *in vitro* Reben zeigten eine gesteigerte Resistenz gegen *P. viticola* durch transkriptionelle Reprogrammierung (Marchive et al., 2013). Für *VvWRKY2* wurde eine Funktion in

der Resistenz gegen *B. cinerea* in Tabak gezeigt, was vermutlich auf die Induktion von *VvPR2* zurückzuführen war (Mzid et al., 2007; Guillaumie et al., 2010). Es konnte nachgewiesen werden, dass *VvWRKY11* durch Infektion mit *P. viticola* induziert wird und die W-Box innerhalb des Promotors bindet und die ektopische Expression führte zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Salzstress in Arabidopsis Sämlingen (Liu et al., 2010). Für die TFs *VpWRKY1*, *VpWRKY2* und *VpWRKY3* aus *Vitis pseudoreticulata* konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau in Arabidopsis führte (Li et al., 2010). Das nächste *VvWRKY33* Homolog aus Arabidopsis ist *AtWRKY33*. Für *AtWRKY33* konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass er die Resistenz gegen nekrotrophe Pilze (Zheng et al., 2006), Salzstress (Jiang und Deyholos, 2008) sowie Hitzestress (Li et al., 2011) positiv beeinflussen kann. Außerdem konnte in Petersilie gezeigt werden, dass *WRKY1* an den Promotor des *PR1* Gens bindet und eine Aktivierung bewirkt. Zusätzlich wiesen die Daten darauf hin, dass *WRKY1* als Antwort auf eine Infektion seine eigene Expression induzieren kann (Eulgem et al., 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass *VvWRKY33* durch die Infektion mit *P. viticola* in der resistenten Rebsorte 'Regent' im Vergleich zur anfälligen Rebsorte 'Chardonnay' induziert wurde (Dissertation L. Welter, 2008). Die vergleichende Amplifikation aus 'Lemberger' und 'Regent' zeigte keine Sequenzunterschiede (**Tabelle 4.2**). Mit Hilfe des Dualen Luciferase Reportersystems konnte nachgewiesen werden, dass *VvWRKY33* die *VvPR10.1* Promotorallele von beiden Rebsorten etwa dreibis sechsfach induzieren konnte (**Abbildung 4.13**). Die transiente Transformation von *VvWRKY33* in Weinrebenblätter der anfälligen Rebsorte 'Shiraz' mit anschließender *P. viticola* Infektion zeigte später, dass *VvWRKY33* die Resistenz gegen den Falschen Mehltau um 70 % verbessern konnte (**Abbildung 4.14**). Die stabile Transformation von *VvWRKY33* in die Arabidopsis knock-out Mutante *wrky33-1* bestätigte die Funktion in der Resistenz gegen den Falschen Mehltau (*H. arabidopsidis*), da der Phänotyp des Wildtyps Col-0 wiederhergestellt und in einigen Linien die Resistenz sogar weiter gesteigert werden konnte. Zusätzlich zeigten die transgenen Linien eine gesteigerte Resistenz gegen den Grauschimmel (*Botrytis cinerea*) (**Abbildung 4.20**).

In dieser Arbeit konnte insgesamt gezeigt werden, dass *VvWRKY33* durch *P. viticola* induziert wurde und die Fähigkeit zur Induktion von *VvPR10.1* hatte. Im funktionellen Assay konnte *VvWRKY33* eine Verbesserung der Resistenz der anfälligen Rebsorte 'Shiraz' gegen *P. viticola* und in der *wrky33-1* knock-out Mutante gegen *H. arabidopsidis* und *B. cinerea* bewirken. Dies deutet auf eine Beteiligung von *VvWRKY33* an der Signaltransduktionskette zur Abwehr verschiedener Pathogene hin.

### 5.2.2.2 *VvERF5* steigert die Resistenz gegen *Plasmopara viticola* im Gegensatz zu *VvCZF1*

TC54435 zeigte eine hohe Homologie zu dem Ethylen-responsiven Transkriptionsfaktor 5 aus *Nicotiana tabacum* und wurde daher als *VvERF5* bezeichnet. ERF Faktoren zeichnen sich durch eine konservierte AP2/ERF Domäne von 60-70 Aminosäuren aus. Außerhalb dieser konservierten Domäne besteht eine hohe Variabilität zwischen den verschiedenen ERF Faktoren (Riechmann und Meyerowitz, 1998). Ethylen-responsive Faktoren (ERF) binden an GCC-Box Elemente welche sich in den Promotorregionen einer Vielzahl von *PR* Genen, wie auch bei *VvPR10.1*, finden lassen (Vom Endt et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass *Tsi1* (*Tobacco stress-induced gene*) ein ERF Faktor aus *Nicotiana tabacum* nach transienter Transformation in Tabak die Expression verschiedener *PR* Gene induziert, was zu einer verbesserten Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* führte (Park et al., 2001). In der Weinrebe konnten der AP2/ERF Superfamilie bisher 149 Mitglieder zugeordnet werden (Licausi et al., 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass *VvERF5* durch die Infektion mit *P. viticola* in der resistenten Rebsorte 'Regent' im Vergleich zur anfälligen Rebsorte 'Chardonnay' induziert wurde (Dissertation L. Welter, 2008). Die vergleichende Amplifikation aus 'Lemberger' und 'Regent' zeigte später, dass hier wahrscheinlich zwei verschiedene ERF Transkriptionsfaktoren amplifiziert wurden (*ERF80* und *ERF82* nach Licausi et al., (2010)), die sich nur außerhalb der beschriebenen Domänen unterschieden und eine Homologie von fast 98 % aufwiesen. *ERF5* aus 'Lemberger' zeigte allerdings eine Deletion von zwei Aminosäuren auf (**Tabelle 4.2**). Auf Grund der großen Homologien innerhalb der ERF Familie, wurden bisher keine Studien zu dieser Deletion durchgeführt. Mit Hilfe des Dualen Luciferase Reportersystems konnte gezeigt werden, dass die *ERF5* TFs aus beiden Rebsorten die *VvPR10.1* Promotorallele ebenfalls von beiden Rebsorten etwa drei- bis sechsfach induzieren konnten (**Abbildung 4.13**). Die transiente Transformation beider TFs in Weinrebenblätter der anfälligen Rebsorte 'Shiraz' mit anschließender *P. viticola* Infektion zeigte später, dass der ERF Faktor aus 'Lemberger' keine signifikante Auswirkung auf die Resistenz hatte und im Gegensatz dazu der ERF Faktor aus 'Regent' die Resistenz um 50-70 % verbessern konnte (**Abbildung 4.14**).

Es konnte gezeigt werden, dass *VvERF5* durch *P. viticola* induziert wurde und die Fähigkeit zur Induktion von *VvPR10.1* hatte. Im funktionellen Assay konnte nur *VvERF5* aus 'Regent' eine Verbesserung der Resistenz der anfälligen Rebsorte 'Shiraz' gegen *P. viticola* bewirken. Dies deutet auf eine Beteiligung von *VvERF5* an der Signaltransduktionskette zur Abwehr des Falschen Mehltaus in der Weinrebe hin. Die Deletion von zwei Aminosäuren scheint maßgeblich dafür verantwortlich zu sein, dass *VvERF5* im 'Lemberger' nicht an der Resistenz gegen *P. viticola* beteiligt ist. Dies muss durch weiterführende Versuche genauer untersucht werden.

TC54167 zeigte eine große Ähnlichkeit zu einem CZF1/ZFAR1 TF aus *Arabidopsis thaliana* und wurde daher als *VvCZF1* bezeichnet. CZF1/ZFAR1 TFs verfügen über eine Zinkfinger-Domäne sowie Ankyrin Wiederholungsdomänen, welche eine der am weitesten verbreiteten Protein-Protein Interaktionsplattformen in der Natur darstellen (Mosavi et al., 2004). Durch die koordinative Bindung eines Zinkions ( $Zn^{2+}$ ) innerhalb der Zinkfinger-Domäne bildet sich eine schleifenförmige 3D-Struktur aus, die als Zinkfinger bezeichnet wird. Es wurde gezeigt, dass eine Induktion dieser TFs in *Arabidopsis* durch eine Inokulation mit *Botrytis cinerea* ausgelöst werden kann. Diese Reaktion scheint dabei unabhängig von JA (Jasmonsäure), ET (Ethylen) und SA (Salicylsäure) ausgelöst zu werden. Ein Funktionsverlust dieser TFs führte zu erhöhter Anfälligkeit gegen Infektionen mit *B. cinerea* (AbuQamer et al., 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass *VvCZF1* durch die Infektion mit *P. viticola* in der resistenten Rebsorte 'Regent' im Vergleich zur anfälligen Rebsorte 'Chardonnay' induziert wurde (Dissertation L. Welter, 2008). Die vergleichende Amplifikation aus 'Lemberger' und 'Regent' zeigte keine Mutationen innerhalb der beschriebenen funktionalen Domänen (**Tabelle 4.2**). Mit Hilfe des Dualen Luciferase Reportersystems konnte gezeigt werden, dass die *CZF1* TFs aus beiden Rebsorten die *VvPR10.1* Promotorallele ebenfalls von beiden Rebsorten etwa dreifach induzieren konnten (**Abbildung 4.13**). Die transiente Transformation beider TFs in Weinrebenblätter der anfälligen Rebsorte 'Shiraz' mit anschließender *P. viticola* Infektion hatte allerdings keine Auswirkung auf die Resistenz (**Abbildung 4.14**).

Es konnte zwar gezeigt werden, dass *VvCZF1* durch *P. viticola* induziert wurde und die Fähigkeit zur Induktion von *VvPR10.1* hatte, aber letztendlich im funktionellen Assay keine Verbesserung der Resistenz der anfälligen Rebsorte 'Shiraz' bewirken konnte. Dies deutet darauf hin, dass *VvCZF1* eher im oberen Bereich der Signaltransduktionskette eine Rolle spielt, der bei den anfälligen Rebsorten im Allgemeinen gestört zu sein scheint (Figueiredo et al., 2008). Alternativ wäre auch das Fehlen anderer notwendiger Cofaktoren in dem Reportersystem denkbar oder sogar eine unspezifische Induktion des *VvPR10.1* Promotors die *in vivo* nicht stattfindet.

### **5.2.3 Die Induktion von *VvPR10.1* in der Weinrebe korreliert mit der Resistenz gegen *P. viticola***

*PR* Gene werden sehr oft nach Pathogeninfektionen in verschiedensten Pflanzenspezies induziert und können in 14 verschiedene Hauptgruppen (*PR1* bis *PR14*) unterteilt werden (Stintzi et al., 1993). Da TFs eine wesentliche Rolle in der Modulation von *PR* Genen wahrnehmen, lässt sich vermuten, dass TFs nach Infektion früh induziert oder sogar mit den *PR* Genen coexprimiert werden (Eulgem, 2005). Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die TFs *VvWRKY33*, *VvERF5* und *VvCZF1* sowohl die *VvPR10.1* Promotorallele der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' als auch der resistenten

Rebsorte 'Regent' in einem Dualen Luciferase Reportersystem spezifisch induzieren konnten (**Abbildung 4.13**). Zusätzlich konnte die zeitlich aufeinander folgende Coexpression von *VvWRKY33* und *VvPR10.1* nach Befall von Weinrebenblättern der resistenten Rebsorte 'Regent' mit *P. viticola* mittels qPCR nachgewiesen werden (**Abbildung 4.17A,B**). In der anfälligen Rebsorte 'Lemberger' fand keine Induktion der Expression der beiden Gene statt. Ferner konnte während des Reifeverlaufs von gesunden Beeren der Rebsorte 'Pinot Noir' eine Induktion von *VvPR10.1* mit Beginn der Reife (Véraison) gemessen werden (**Abbildung 4.17D**).

Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass in gesunden Weintrauben Abwehr- und Stressgene, welche PR Proteine wie Chitinasen, Thaumatin-ähnliche Proteine, Stilbensynthasen oder Ribonukleasen kodieren, während der Beerenreife unterschiedlich exprimiert werden (Robinson et al. 1997; Salzman et al. 1998). Diese werden generell mit dem Beginn der Véraison hochreguliert und ihre Expression nimmt mit fortschreitender Reife (Zuckereinlagerung) immer weiter zu (Robinson et al., 1997). Der Anstieg an Zucker und Nährstoffen in den Beeren mit Beginn der Véraison erhöht kontinuierlich das Risiko einer Pathogeninfektion (Terrier et al. 2005; Lijavetzky et al. 2012).

Ferner konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die transiente Transformation von *VvWRKY33* in Weinrebenblätter der anfälligen Sorte 'Shiraz' eine temporäre Induktion und Akkumulation von *VvPR10.1* zur Folge hatte. Die Expression von *VvPR10.1* führte mit steigender Anhäufung zu einer kontinuierlich steigenden Resistenz gegen *P. viticola* (**Abbildung 4.16**). In einer vergleichbaren Studie konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *Vitis pseudoreticulata* *VpPR10.2*, dem direkten Homolog von *VvPR10.2*, in der anfälligen Rebsorte 'Carignane' die Resistenz gegen *P. viticola* steigern konnte. Außerdem konnte für das rekombinante *VpPR10.2* Protein eine DNase Aktivität gegen genomische Wirts-DNA und eine RNase Aktivität gegen Hefe-RNA *in vitro* gezeigt werden (He et al., 2012).

PR10 Proteine sind in der Pflanzenwelt weit verbreitet und die Mitglieder dieser Gruppe haben die Größe des Proteins und die Anordnung der Sekundärstruktur gemeinsam. Sie sind mit etwa 160 Aminosäuren (AS) relativ klein, aber die äußere Oberfläche dieser Proteine ist von großem Interesse, da Epitope einer PR10 Untergruppe beim Menschen allergische Reaktionen auslösen können (Fernandes et al., 2013). Die *PR10* Multigen-Familie in *Vitis vinifera* kann bis heute zusätzlich in 17 weitere Untergruppen (*PR10.1* bis *PR10.17*) unterteilt werden, die alle innerhalb eines kleinen Clusters auf Kopplungsgruppe 5 liegen. Ihre genaue biologische Funktion konnte aber bisher nicht geklärt werden (Lebel et al., 2010). Bis heute sind nur drei verschiedene *PR10* Gene in Wein beschrieben worden. Die Induktion von *VvPR10.1* wurde in der resistenten Rebsorte 'Ugni blanc' nach Befall mit *Pseudomonas syringae* gezeigt (Robert et al., 2001), während die Expression von *VvPR10.1*, *VvPR10.2* und *VvPR10.3* während der Induktion der somatischen Embryogenese in der Rebsorte 'Chardonnay' detektiert wurde (Maillot et al., 2009). Zusätzlich zeigten einige Studien eine starke und spezifische Produktion von PR10 Proteinen in *V. vinifera* unter Salz- und Herbizidstress

(Castro et al., 2005; Jellouli et al., 2008) sowie nach Pilzinfektionen (Fung et al., 2008; Polesani et al., 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass der *VvPR10.1* Promotor durch die TFs *VvWRKY33*, *VvERF5* und *VvCZF1* positiv reguliert werden konnte. Die Induktion von *VvPR10.1* nach Infektion von Weinrebenblättern der resistenten Rebsorte 'Regent' im Vergleich zur anfälligen Rebsorte 'Lemberger' mit *P. viticola*, konnte über qPCR Analysen bestätigt werden. Zusätzlich konnte die Induktion von *VvPR10.1* in gesunden Beeren der Rebsorte 'Pinot Noir' mit Beginn der *Véraison* gemessen werden. Die Induktion von *VvPR10.1* durch transiente Expression von *VvWRKY33* in Blättern der anfälligen Rebsorte 'Shiraz' führte zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber *P. viticola*.

### 5.2.4 Fazit

Eine Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren nach Infektion mit *P. viticola* konnte nur in der resistenten Rebsorte 'Regent' nachgewiesen werden. Die ektopische Expression einiger Kandidatengene in der anfälligen Rebsorte 'Shiraz' konnte auch hier zur Auslösung einer Abwehrantwort und somit zu einer verbesserten Resistenz führen. Das Wissen über Resistenzmechanismen in Wein ist sehr begrenzt. Die Ergebnisse dieser Experimente deuten darauf hin, dass die induzierbaren Resistenzmechanismen wie die Aktivierung von *PR* Genen in anfälligen Pflanzen prinzipiell vorhanden sind und durch geeignete Signale aktiviert werden können, was auch zu einer gesteigerten Resistenz gegen Pathogene führen kann. Im Bezug auf den Falschen Mehltau scheinen anfällige *Vitis vinifera* Pflanzen offensichtlich nicht in der Lage zu sein das Pathogen rechtzeitig oder überhaupt zu erkennen und können deshalb die präformierten Abwehrmechanismen nicht aktivieren. Die fehlende Coevolution zwischen *V. vinifera* und den biotrophen Pathogenen kann möglicherweise das Fehlschlagen des Erkennungsprozesses erklären.

### 5.2.5 Ausblick

Zur Aufklärung der Signaltransduktionskette in der Weinrebe für die Abwehr von *P. viticola* sollen im nächsten Schritt stabil transformierte Weinreben erzeugt werden. Hierbei sollen *VvWRKY33* und *VvERF5* zum Einen überexprimiert und zum anderen ausgeschaltet werden. Anschließend sollen Proben der Pflanzen vor und nach der Pathogeninfektion für die RNASeq Analyse eingesetzt werden. Hierdurch könnten weitere Zielgene der TFs identifiziert werden.

Zusätzlich soll die Induzierbarkeit der Promotoren weiterer bereits bekannter Kandidatengene aus der Abwehr des Falschen Mehltaus untersucht werden, um Signaltransduktionskaskaden aufzuklären.

## 6 Material und Methoden

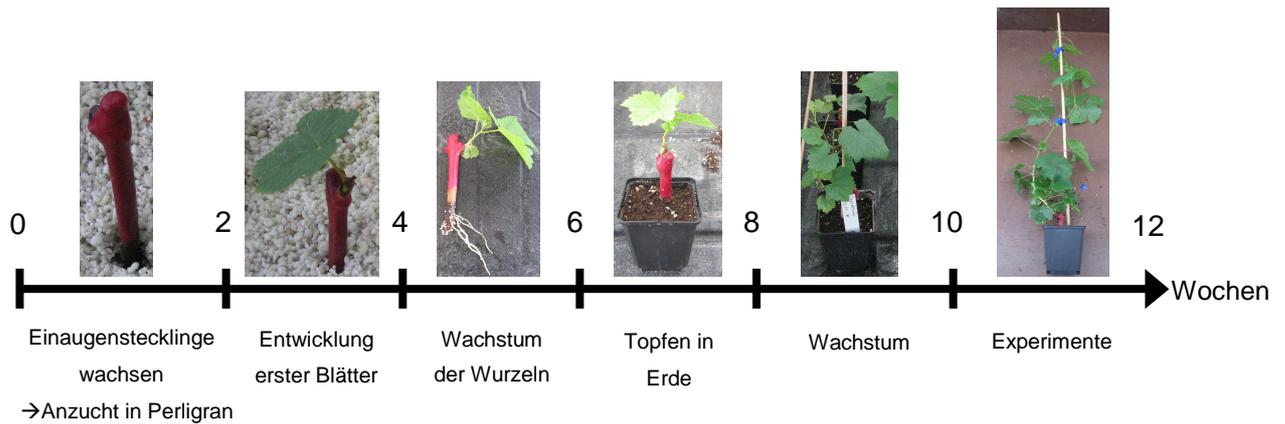
### 6.1 Pflanzenmaterial

#### 6.1.1 Weinreben

Beerenmaterial einer Weinreben-Entwicklungsserie (*V. vinifera* L. cv. 'Pinot Noir') wurde von einem kommerziellen Weinberg in der Saison 2007 - 2008 in Schriesheim, Deutschland bei gemäßigttem Klima und Durchschnittstemperaturen von 22 °C zu verschiedenen Zeitpunkten während der Beerenentwicklung gesammelt. Die Proben wurden vom Beginn der Blüte bis zur Beerenreife genommen, indem etwa 100 Beeren von 20 verschiedenen Weinstöcken in wöchentlichen Abständen beprobt wurden (Downey et al., 2003; Höll et al., 2013). Alle Proben wurden bereits auf dem Weinberg in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Gewächshausreben wurden aus Stecklingen gezogen die nach dem Laubfall im Winter (Winterruten) geschnitten wurden. 'Lemberger' und 'Regent' wurden auf Weinbergen des JKI Geilweilerhof, Siebeldingen, Deutschland geschnitten. 'Shiraz' wurde auf einem Weinberg des DLR Rheinpfalz Mussbach, Neustadt, Deutschland geschnitten. Die aus den Ruten frisch geschnittenen Einaugenstecklinge wurden zunächst 24 h gewässert und anschließend 8 h in Chinoplant (3 % (w/v)) oberflächensterilisiert. Die Stecklinge konnten anschließend bei 6 °C bis zu einem Jahr im dunklen Kühlraum gelagert werden.

##### 6.1.1.1 Anzucht von Weinreben im Gewächshaus

Für die Experimente wurden selbst angezogene Gewächshausreben verwendet. In der nachfolgenden Abbildung (**Abbildung 6.1**) sind die verschiedenen Entwicklungsstadien und der zeitliche Verlauf der Entwicklung der Weinreben im Gewächshaus dargestellt.



**Abbildung 6.1: Zeitlicher Verlauf der Entwicklung von Weinreben im Gewächshaus.**

Fotos wurden mit einer Canon EOS 600D (Canon) zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten zwischen 0 und 12 Wochen nach dem Ausstecken der Einaugenstecklinge aufgenommen.

Die Einaugenstecklinge wurden zum Schutz vor dem Austrocknen mit Wachs überzogen. In diesem Wachs waren zusätzlich Fungizide enthalten um eine latente Infektion mit Sporen die am Holz überwintern zu verhindern. Zur besseren Wasseraufnahme und zur leichteren Wurzelbildung wurden die Stecklinge zunächst in Perligran (Naturgestein Perlit) angezogen. Auf Grund der hohen Menge an eingelagerten Speicherstoffen, bilden die Pflanzen zunächst Blätter zur Photosynthese aus. Anschließend bilden sich die Wurzeln aus um Wasser und weitere Nährstoffe aufzunehmen. Sobald genügend Wurzelwerk vorhanden war, wurden die Pflanzen in Erde umgetopft und bis zum Erreichen der benötigten Größe wachsen gelassen.

## 6.1.2 Tabak

Für die transiente Agrobakterien-vermittelte Transformation wurden *Nicotiana benthamiana* L. (Wildtyp) Blätter von Gewächshauspflanzen im 5-10 Blattstadium vorm Eintreten der Blüte verwendet.

Für die stabile Transformation wurden 8-12 Wochen alte sterile *in vitro* Pflanzen der Sorte *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun-NN (Wildtyp) verwendet.

## 6.1.3 Arabidopsis

*Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0), Moscow-0 (Ms-0) und *wrky33-1* (SALK\_006603) Samen wurden bezogen vom Arabidopsis Biological Resource Centre (Ohio, USA).

Samen der *eds1-2* Mutante wurden zur Verfügung gestellt von der AG Paul Schulze-Lefert, MPIPZ, Köln, Deutschland.

## 6.1.4 Suspensionskulturen

Es wurde eine Suspensionskultur die aus Kallusgewebe von Blattstielen von *V. vinifera* L. cv. 'Chardonnay' etabliert wurde, verwendet. Diese Kultur wurde wöchentlich subkultiviert indem 10 ml Kultur in der log-Phase zu 50 ml frischem Grape Cormier (GC) Medium (Do und Cormier, 1991) gegeben wurden. Die Suspensionskultur wurde durchgehend bei konstanten 25 °C und 90 Rpm in Dunkelheit geschüttelt.

## 6.1.5 Medien

*In vitro* Pflanzen wurden auf Chee und Pool (C2D) Vitis Medium (Duchefa, Haarlem Niederlande) inklusive Makro- und Mikronährstoffen wie zuvor beschrieben (Chee und Pool, 1987) kultiviert.

Grape Cormier (GC) Medium wurde wie folgt angesetzt: 3,2 g/l Gamborgs B5 mit Mikronährstoffen (Sigma Medium G5893), 30 g/l Sukrose, 0,25 g/l Casein Hydrolysat, 0,93 µM Kinetin, 0,54 µM NAA, pH 5,8 (mit 1 N KOH). Für GC Agarplatten wurden 0,8 % Pflanzenagar (Duchefa) zum Medium gegeben.

## 6.2 Mikrobiologische Techniken

### 6.2.1 Bakterienstämme

#### 6.2.1.1 *Escherichia coli*

Für die Klonierungen wurden die *E. coli* Stämme XL1-Blue (Stratagene) oder DH5α (Invitrogen) verwendet. Genotypen:

**XL1-Blue:** recA1 endA1 gyrA96 (nal<sup>r</sup>) thi-1 hsdR17(rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15::Tn10(tetr)]

**DH5α<sup>TM</sup>:** F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) phoA upE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1

Die Bakterienstämme wurden auf Low Salt Luria Bertani (LB) Medium angezogen (5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton/Pepton). Für LB Agarplatten wurden 2 % (w/v) Baktoagar (Difco) vor dem Autoklavieren zum Medium gegeben. Alle Medien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50 °C wurden die entsprechenden Antibiotika in geeigneter Konzentration zugegeben. *E. coli* wurden bei 37 °C im Brutschrank auf Agarplatten inkubiert bzw. bei 37 °C und 200 Rpm in Flüssigkultur auf dem Inkubator geschüttelt.

### 6.2.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transformation von Weinreben, Tabakpflanzen und Arabidopsis wurde der Agrobakterienstamm C58C1 ATHV Rif<sup>R</sup>, ein Derivat von EHA101 verwendet (Tang et al., 2000). Dieser Stamm trägt das Ti-Helferplasmid pEHA101 (Hood et al., 1986).

Die Bakterien wurden auf Low Salt LB Medium oder YEB Medium (1 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Fleischextrakt, 5 g/l Trypton/Pepton, 5 g/l Sukrose, 0,493 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, pH 7.5) angezogen. Für LB und YEB Agarplatten wurden 2 % (w/v) Baktoagar (Difco) vor dem Autoklavieren zum Medium gegeben.

## 6.2.2 Herstellung kompetenter Zellen

Der entsprechende *E. coli* Stamm wurde zunächst neu auf LB Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20 ml LB Medium mit einer einzelnen Kolonie als Starterkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 Rpm geschüttelt. Anschließend wurde 1 l LB Medium mit entsprechenden Antibiotika mit der Starterkultur beimpft. Die Hauptkultur wurde erneut über Nacht bei 37 °C und 200 Rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7-1,0 (Log-Phase) wachsen gelassen. Die Kultur wurde dann auf 4 °C runtergekühlt und in 250 ml Zentrifugenbecher umgefüllt. Die Zellen wurden in der Zentrifuge bei 4000 Rpm für 15 min pelletiert und die Pellets anschließend zweimal mit je 500 ml eiskaltem bidestilliertem Wasser gewaschen. Nach erneutem Waschen der Pellets mit 20 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin wurden diese in je 2 ml 10 %-igem Glycerin resuspendiert. Die Suspension wurde zum Schluss als 50 µl Aliquots in 250 µl Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 10 pg eines Standardvektors (z.B. pUC19) in ein *E. coli* Aliquot transformiert und anschließend auf einer LB Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert um am folgenden Tag die Kolonien zu zählen. Mit Hilfe der Formel:

Transformationseffizienz ( $E_t$ ) = Kolonien/ $\mu$ g/Verdünnungsfaktor konnte die Effizienz berechnet werden. Diese musste mindestens  $2 \times 10^8$  KbE/ $\mu$ g DNA betragen.

Zur Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien wurde eine einzelne Kolonie eines frischen über Nacht Ausstriches auf einer YEB Medium Agarplatte in 10 ml YEB Medium mit Rifampicin (100  $\mu$ g/ml) für die chromosomale Resistenz angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 200 Rpm geschüttelt. Die über Nacht Starterkultur wurde anschließend in 200 ml YEB Medium überführt und erneut über Nacht bei 28 °C und 200 Rpm bis zu einer OD600 von 0,7-1,0 (Log-Phase) wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur auf 4 °C runtergekühlt und bei 2000 Rpm für 5 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden danach zweimal mit je 10 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin, 1 mM HEPES, pH 7 gewaschen. Zum Schluss wurden die Pellets in 2 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin, 1 mM HEPES, pH 7 resuspendiert und 50  $\mu$ l Aliquots bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **6.2.3 Transformation**

Zur Transformation mittels Elektroporation wurden 50  $\mu$ l Zellen auf Eis aufgetaut und 1  $\mu$ l DNA zugegeben. Die Zellen wurden dann im BioRad GenePulser II (BioRad) bei 200 W, 1,8 kV und 25  $\mu$ F transformiert. Die transformierten Zellen wurden in 1 ml SOC Medium (20 g/l Trypton, 0,5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 0,186 g/l KCl, 2,03 g/l MgCl<sub>2</sub>, 3,96 g/l Glukose x 1 H<sub>2</sub>O, pH 7) aufgenommen. Anschließend wurden *E. coli* Zellen 60 min bei 37 °C und 200 Rpm sowie Agrobakterien für 2 h bei 28 °C und 200 Rpm vorsichtig inkubiert. Danach konnten die Zellen auf selektiven LB oder YEB Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht inkubiert werden.

### **6.2.4 Lagerung**

Glycerinstocklösungen der verschiedenen Bakterienstämme wurden durch Mischen von 800  $\mu$ l über Nacht Kultur der entsprechenden Bakterien mit 200  $\mu$ l 100 %-igem Glycerin hergestellt. Diese mussten umgehend gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden um sie anschließend bei -80 °C lagern zu können.

## 6.3 DNA Techniken

### 6.3.1 Klonierung der Promotoren / Transkriptionsfaktoren / Rezeptoren

Die Klonierung und Analyse der Promotoren wurde vom Projektkooperationspartner am JKI in Siebeldingen durchgeführt. Für den *VvPR10.1* Promotor wurde ein 2534 bp großes Fragment mittels Phusion<sup>®</sup> Polymerase (Finnzymes) aus gDNA von *V. vinifera* (cv. 'Lemberger' und 'Regent') amplifiziert. Dieses Fragment wurde über ein Agarosegel aufgereinigt, mit den Enzymen *KpnI* und *NotI* (NEB) geschnitten und in den Vektor pLUC (Horstmann et al., 2004) kloniert (Dissertation T. Moser, 2014).

Für die Klonierung der Transkriptionsfaktoren (TF) wurden die Offenen Leserahmen (ORF) aus cDNA von *V. vinifera* (cv. 'Lemberger' und 'Regent') mittels Phusion<sup>®</sup> Polymerase (Finnzymes) amplifiziert. Die Konstrukte wurden nach einem Restriktionsverdau mit entweder *XhoI* und *XbaI* oder *BamHI* und *XbaI* (Fermentas) in den Vektor pART7 (Gleave, 1992) unter Kontrolle des CaMV 35S konstitutiven Promotors kloniert. Durch einen Verdau mit *NotI* konnten die TFs in den binären Vektor pART27 (Gleave, 1992) umkloniert werden.

Für die Klonierung der *VRP1* Rezeptoren wurden die ORFs aus cDNA und gDNA von *V. vinifera* (cv. 'Lemberger' und 'Regent') mittels Phusion<sup>®</sup> Polymerase (Finnzymes) amplifiziert und mit den AttB Adaptern fusioniert. Anschließend wurden die Konstrukte mittels Rekombination in den GATEWAY (Invitrogen) Ausgangsvektor pDONR201 (Invitrogen) kloniert. Von hier konnten alle Konstrukte durch erneute Rekombination in die verschiedenen Zielvektoren pB2GW7 ohne Reportergen sowie pB7FWG2 und pB7WGF2 (Karimi et al., 2002) mit N- bzw. C-terminalem GFP Tag umkloniert werden.

Alle klonierten Konstrukte wurden vor der Verwendung sequenziert und die Sequenzen auf Richtigkeit geprüft.

### 6.3.2 Oligonukleotide

Die Software Primer3 ([http://biotools.umassmed.edu/ioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/ioapps/primer3_www.cgi)) wurde zum Entwerfen der Oligonukleotide auf Grundlage der Weinrebensequenzen verwendet. Die Weinrebensequenzen wurden durch Vergleich der Sequenzen des Modellgenoms von PN40024 (Jaillon, 2007) (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>) mit den vorläufigen Contig-Sequenzen des DFCI Grape Gene Index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=grape>) gewonnen. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Deutschland) bezogen und sind in

den nachfolgenden Tabellen aufgelistet. Die lyophilisierten Primer wurden mit destilliertem Wasser zu einer Endkonzentration von 100 pmol/μl (100 μM) gelöst. Diese Stocklösung wurde 1:10 (10 μM) zum Sequenzieren und für die qPCR sowie 1:4 (25 μM) für die Standard PCR verdünnt.

**Tabelle 6. 1: Oligonukleotide zur Klonierung der Transkriptionsfaktoren**

Oligo Name	Sequenz 5' → 3'	Fragmentlänge / bp
MybBF+XhoI	TGACTCGAG GCCAGAGGTTAGAGTAGTGGTG	943
MybBR+BamHI	TGAGGATCC TTCCGCTTTTTGCTTTCTTG	
WRKY1-ORF+XhoI-F2	TGACTCGAG ATGGATAGCTTCTCCACTCTCTTT	625
WRKY1-ORF+XbaI-R2	TGATCTAGA GGACTAATTAAGGAAGCATAA	
WRKY2-ORF+XhoI-F2	TGACTCGAGTTCTCTTAAAGCTTCTCTTTCT	1724
WRKY2-ORF+XbaI-R2	TGATCTAGATTTGCTTTTGCTCCTGAA	
WRKY3-ORF+XhoI-F2	TGACTCGAGTTTGATGGTGGCCAAGACAT	1060
WRKY3-ORF+XbaI-R2	TGATCTAGATGCTCTACCATTTTCTTGATCT	
ERF1-ORF+XhoI-F2	TGACTCGAGAAGAAGAAGAAGGAGAAGAA	615
ERF1-ORF+XbaI-R2	TGATCTAGATGATGACTTCGTCTCAAAA	
ERF5-ORF+XhoI-F2	TGACTCGAGCATTGATATGGCAGAAGA	862
ERF5-ORF+XbaI-R2	TGATCTAGACTCCTTTGATTCAAACATAAG	
CZF1-ORF+XhoI-F2	TGACTCGAGACTACTCTTTGAGGGTTAC	2120
CZF1-ORF+XbaI-R2	TGATCTAGAGTTGCAGCAGATATGTTG	

**Tabelle 6. 2: Oligonukleotide zum Test der transgenen Arabidopsis Pflanzen**

Oligo Name	Sequenz 5' → 3'	Funktion
RPW8.1 F	GACCCGTACAGTACTAAGTCTA	Phänotyp
RPW8.1 R	GATTTCCGAAATTGATTACAAGAA	
RPW8.2 F	AACTCTTCACCTCGAGAGCTAACA	Xiao et al., 2011
RPW8.2 R	AGTCGTTTGACACAATTGGGACAT	
AtWRKY33 LB-R	AAACGTCCGCAATGTGTTAT	Mutanten Check Li et al., 2011
AtWRKY33-F	TCCAATTTCTTCTTCGTTTGGGA	
AtWRKY33-R	ATGGACAATAGCAGAACCAGACA	
SALK-LB-R	TGTTACGTTAGTGGGCCATCG	

Tabelle 6. 3: Oligonukleotide zur Klonierung der VRP Konstrukte

Oligo Name	Sequenz 5' → 3'	Fragment / bp	Funktion
VRP1-1 CF	AttB-ATGGCTTTGGAAACTGTCCGAGGGG	2453 (4463)	VRP+AttB
VRP1-1 CR	AttB-CAAGCCAATTTAAATCGGTAGTCTCT		C-terminal
VRP1-2 CF	AttB-TATGGAAATTATTGGACAAGCCGTTT	2492 (3036)	VRP+AttB
VRP1-2 CR	AttB-CAACAAGCCAATCTAAGTCAGTTGTC		C-terminal
VRP1-3 CF	AttB-ATGGAAATTGTTGGAGAAGCCGTTT	2498 (3417)	VRP+AttB
VRP1-3 CR	AttB-CACGAAGCCAATCTAAGTCAACTGTG		C-terminal
VRP1-1 KF2	TATTTGGGTTCCGGGAGGTAG	1076 (3052)	Kontrolle
VRP1-1 KR2	CCACTCAGGGAGCTTATTTT		
VRP1-2 KF2	GGTTGCTATGCCCGTAAATC	1112 (1625)	Kontrolle
VRP1-2 KR2	CCAATCAGGGAGCTTGTTT		
VRP1-3 KF2	CAAGACCCGGATGTTAAAGG	1259 (2235)	Kontrolle
VRP1-3 KR2	GATTGAAACCCGCTCTAACC		
VRP1-1 F2	GCTGAGCGCAATTCTTGATTCC	2400 (4475)	VRP
VRP1-1 R2	GGGAGAACAGCTTGGAAGAAA		
VRP1-2 F	TCTCGATATGGAAATTATTG	2440 (3046)	VRP
VRP1-2 R	ATTTCAAACAAGCCAATC		
VRP1-3 F	TTCTCGATATGGAAATTG	2445 (3428)	VRP
VRP1-3 R	ATTTCAACGAAGCCAATC		
VRP1-1 NF	AttB-TTTATGGCTTTGGAAACTGTCCGAGGGG	2453 (4463)	VRP+AttB
VRP1-1 NR	AttB-CTCAAAGCCAATTTAAATCGGTAGTCTCT		N-terminal
VRP1-2 NF	AttB-TTTATGGAAATTATTGGACAAGCCGTTT	2492 (3036)	VRP+AttB
VRP1-2 NR	AttB-CTCAAACAAGCCAATCTAAGTCAGTTGTC		N-terminal
VRP1-3 NF	AttB-TTTATGGAAATTGTTGGAGAAGCCGTTT	2498 (3417)	VRP+AttB
VRP1-3 NR	AttB-CTCAACGAAGCCAATCTAAGTCAACTGTG		N-terminal
VRP1-2+EGFP XbaI F	TGATCTAGAGCAGGCTATGGAAATTATTGGACAAG	3159	Fusion
VRP1-2+EGFP BamHI R	TGAGGATCCGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC		
EGFP+VRP1-2 XbaI F	TGATCTAGACGCACTAGTATGGTGAGCAAG	3159	Fusion
EGFP+VRP1-2 BamHI R	TGAGGATCCAAGAAAGCTGGGTTCAAACAAG		

Tabelle 6. 4: Oligonukleotide für die qPCR Analysen

Oligo Name	Sequenz 5' → 3'	Fragment / bp	Funktion
QPCR-MYBB-F	CAGTCGCAGACGAATTACAGCTT	80	qPCR
QPCR-MYBB-R	CTCCATGCCATCATCCATCA		
QPCR-WRKY1-F	AGAGATGAGATCATTGCAGCTGAA	94	qPCR
QPCR-WRKY1-R	GTCACACCAAATCTTTGGATCTCA		
QPCR-WRKY2-F	ATTCAAGCACTAGTATGAACAGAGCAG	74	qPCR
QPCR-WRKY2-R	CCTTGTTGCCTTGGCATGA		
QPCR-WRKY3-F	CGCTGGTCTCATCCTAGAATCTTC	69	qPCR
QPCR-WRKY3-R	GAGCTGCTATTCTACTCCTGTTGCT		
QPCR-ERF1-F	CACTGTTGCGGAATCACAAGA	99	qPCR
QPCR-ERF1-R	GCCCATGGATACTTACTTTGATCA		
QPCR-ERF5-F	CACCGTTAACGCCGTTATCAC	87	qPCR
QPCR-ERF5-R	TGTCTTTGGTAAGGTAAACTCCTTTGAT		
QPCR-CZF1-F	GCAGTAGCAGCAGCAGTGATG	80	qPCR
QPCR-CZF1-R	ATACCTCCCCTATCGATGAAGCT		
QPCR-PR10-F	GCACATCCCGATGCCTATTAAG	101	qPCR
QPCR-PR10-R	ACTTACTGAGACTGATAGATGCAATGAATA		
QPCR-STS1-F	CGAAGCAACTAGGCATGTGT	100	qPCR
QPCR-STS1-R	CTCCCAATCCAATCCTTCA		
QPCR-VvWRKY2-I-F	GGTAGTGGCAGCCATTTTGT	126	Nachweis Transgen
QPCR-VvWRKY2-I-R	TTGGGGGTTAGCGTTAGTTG		
QPCR-VvERF5-I-F	AGGAGTACTTGCCCGAATCC	138	Nachweis Transgen
QPCR-VvERF5-I-R	TTAACGGTGGCAGATGGAAT		
QPCR-VvCZF1-I-F	ATGGCCTCAACTGATGAACC	85	Nachweis Transgen
QPCR-VvCZF1-I-R	AACCAAACAGCCCAGATGAG		
QPCR VRP1-1/2/3 F Eva	AAGAAAAGCTCCTATACTGTTGGTCCT	62	qPCR
QPCR VRP1-1 R Eva	TGAAGAGGGAATTCAGGTTTCCTT		
QPCR VRP1-2/3 R Eva	GGAATTCAGGTTCAACCCTAATATCA	73	
QPCR-HK-GAPDH-F	ACAGTCCCCTGTGATCGA	80	qPCR
QPCR-HK-GAPDH-R	TAAAAGCTCTGCCCTTGGAAT		
QPCR-HK-EF1a-F	AACCAAATATCCGGAGTAAAAGA	82	qPCR
QPCR-HK-EF1a-R	GAAGTGGGTGCTTGATAGGC		
QPCR-HK-Ubiquitin-F	GTGGTATTATTGAGCCATCCTT	182	qPCR
QPCR-HK-Ubiquitin-R	AACCTCCAATCCAGTCATCTAC		
QPCR-AtWRKY33-F	TTGTGGGAGTGAACCTG	103	
QPCR-AtWRKY33-R	TAACCGTCGTCAAGAAT		
QPCR-AtWRKY33-endogen-F	AAAAGGAACCAGTTGTTCTTTTTT	101	Li et al., 2011
QPCR-AtWRKY33-endogen-R	TCCGTGTTCTAGTTCTATGGTACAAA		
QPCR-HK-AtActin2-F	TGTGCCAATCTACGAGGGTTT	98	
QPCR-HK-AtActin2-R	TTTCCCGCTCTGCTGTTGT		

**Tabelle 6. 5: Oligonukleotide zur Sequenzierung**

Oligo Name	Sequenz 5' → 3'
VRP1-1 Seq 1	AACCTGCCTAGGTTGCATAC
VRP1-1 Seq 2	TCTATGTCACCGTGTCCAAG
VRP1-1 Seq 3	CAGCCAGGAACCTATGGAAC
VRP1-2 Seq 1	GAAACAAGCTCCCTGATTGG
pDONR201 F	GCAGTTCCTACTCTCGC
pDONR201 R	CATCAGAGATTTTGAGACAC
pART7 35S F	CAATCCCCTATCCTTCGCAA
pART7 OCS R	GGCGGTAAGGATCTGAGCTA
VRP1-2 Seq 2	GCTGAAGGACTGCTTTATGG
VRP1-1 Seq 4	CGGCACTCAGCATTCTGAC
VRP1-3 Seq 1	CCTGGAGGATGTGGGAAGAC
VRP1-1 Seq1 R	TCCGTTGCCTGAAAGTTGAG
CZF1 Seq1	GTTTCGAGTGCTGGCTCCATC
EGFP Seq R	AGACTGGTGATTTTTGCGGACT
LUC_F	CTAACATACGCTCTCCATCA
LUC_R	GGATAGAATGGCGCCGG
pJet 1.2 fwd	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJet 1.2 rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

### 6.3.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die spezifische Amplifikation von DNA Sequenzen wurde die PCR unter Verwendung einer einfachen DreamTag Polymerase (Fermentas) für Kontrollreaktionen oder einer Phusion® Polymerase (Finnzymes) mit einer Korrekturlesefunktion (Proofreading) für Klonierungen benutzt. Die PCR Reaktionen wurden nach Herstellerangaben (50 µl Standardansatz, 40 Zyklen, Annealingtemperatur: 58°C) angesetzt und in einem Laborcycler mit Gradientenfunktion (SensoQuest) durchgeführt. Die Reaktionspuffer wurden wie den Enzymen beigelegt verwendet und enthielten bereits MgCl<sub>2</sub>.

### 6.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die DNA Fragmente wurden auf 1,5 %-igen Agarosegelen in TAE-Puffer (Sambrook et al., 1989) durch Versetzen mit dem Ladepuffer DNA-Dye Non Tox (Appllichem) aufgetrennt. Als Größenstandard zur Abschätzung der Fragmentgröße wurde der GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder

(Fermentas) als Marker verwendet. Das Gel wurde bei 80-120 V für 45-60 min laufengelassen und anschließend auf dem UV-Tisch (302 nm) unter Verwendung der Herolab Software betrachtet.

### **6.3.5 PCR Aufreinigung**

Zur Aufreinigung von PCR Produkten oder der Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde das GeneJET PCR Clean Up Kit (Fermentas) nach Herstellervorgaben verwendet.

### **6.3.6 Isolierung von Plasmid DNA**

Für Präparationen im Mini Maßstab (< 200 ng/µl) wurden 5 ml einer bakteriellen über Nacht Kultur verwendet und mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Für Präparationen im Maxi Maßstab (> 500 ng/µl) wurde ein eigenes Protokoll verwendet. Eine 2,5 ml Vorkultur in LB Medium mit entsprechenden Antibiotika wurde mit einer einzelnen Kolonie beimpft und 5 h bei 37 °C und 200 Rpm wachsen gelassen. Hiermit wurden anschließend 500 ml Hauptkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 Rpm wachsen gelassen. Die Zellen wurden am nächsten Tag in 250 ml Zentrifugenbechern bei 4 °C für 15 min bei 5500 Rpm in einer Beckmann J2-21 Zentrifuge (JA-14 Rotor) abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 8 ml eiskaltem TE 50/1 Puffer (50 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8) resuspendiert und in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Hier wurden sie mit 2,5 ml frisch hergestellter Lysozymlösung (10 mg/ml in TE 50/1) vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8, eingestellt mit 10 N NaOH) zugegeben und erneut 5 min auf Eis inkubiert bevor sofort 1 ml Ribonuklease A Lösung (2 mg/ml Ribonuklease A, 1,5 % Triton X-100 in TE 50/1) zugegeben wurde. Um die Lyse der Zellen abzuschließen wurde die Mischung für 60 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Mischung bei 4 °C für 30 min bei 15000 Rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde nun 1:1 mit Phenol (pH 8) vermischt und gründlich für 1 min geschüttelt. Die beiden Phasen wurden durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 20 min separiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 1:1 mit Chloroform gemischt. Nach 1 min gründlichem Schütteln wurde die Mischung erneut für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert und wieder die obere wässrige Phase in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Fällung der DNA wurden 10 % des Volumens 5 M NaClO<sub>4</sub> und 80 % des Volumens Isopropanol zugegeben. Die Lösung wurde für 30 min bei 6000 Rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend getrocknet und sofort über Nacht in 500 µl TE Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8) lösen

gelassen. Die Lösung wurde zum Schluss in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert.

### **6.3.7 DNA Quantifizierung**

Die Konzentration und Qualität der DNA wurde durch Messung in einem Nanodrop (PEQLAB) überprüft. Zur Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentrationen wurde die Lambert-Beer Gleichung  $E = \epsilon \times c \times b$  angewendet (c: Nukleinsäurekonzentration (ng/μl); E: Absorption;  $\epsilon$ : Extinktionskoeffizient (20 μl μg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> für dsDNA); b: Schichtdicke (cm)). Die Reinheit der DNA wurde durch Messung des OD260/OD280 Wertes kontrolliert, welcher zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

### **6.3.8 Restriktionsverdau**

Der Restriktionsverdau wurde mit Enzymen der Firma Fermentas und beigefügten Puffern durchgeführt. Für den analytischen Verdau wurden 0,5 μg und für den präparativen Verdau 5 μg Plasmid DNA verwendet. Die Inkubation erfolgte für 2 bis 16 h bei der vorgegebenen Idealtemperatur (meistens 37 °C). Im Normalfall wurden 3 U Enzym pro μg DNA verwendet.

### **6.3.9 Ligation und Rekombination**

Die Ligation der verdauten DNA Fragmente wurde unter Verwendung der T4 DNA Ligase (Fermentas) durchgeführt. Das Insert wurde in ein- bis zehnfachem molarem Überschuss zu 25 ng Vektor gegeben. Die optimale Zusammensetzung wurde mit Hilfe des Ligation Calculators ([http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig\\_Input.html](http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html)) berechnet. Die Ligation erfolgte entweder für 1h bei Raumtemperatur über bei 4 °C über Nacht.

Für die GATEWAY Rekombination wurden die Enzyme der Firma Invitrogen verwendet. Zunächst wurde die DNA wie im Herstellerprotokoll empfohlen mittels PEG/MgCl<sub>2</sub> Fällung aufgereinigt um die Effizienz zu steigern. Anschließend wurden 3 μl des aufgereinigten PCR Produktes nach Herstellerangaben mittels BP Clonase II in den Ausgangsvektor pDONR201 kloniert. Die Rekombination in die Zielvektoren erfolgte dann mittels LR Clonase II.

### 6.3.10 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden im Auftrag von der Firma Eurofins MWG Operon (Deutschland) nach der Anleitung für Value Reads durchgeführt.

### 6.3.11 Quantitative Echt-Zeit PCR (qRT-PCR / qPCR)

Die Transkriptmenge (mRNA) ausgesuchter Gene wurde mittels qPCR unter Verwendung der SYBR Green Methode in einem Rotor-Gene Q Cycler (QIAGEN, Deutschland) bestimmt. Für die Messungen wurde der Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Fermentas) laut Herstellerangaben verwendet. Zu 20 µl Master Mix wurden jeweils 5 µl cDNA (1:10 verdünnt) gegeben und in Triplikaten vermessen. Das Temperaturprotokoll wurde nach Herstellerangaben verwendet und eine Schmelzkurve von 56 bis 96 °C im Anschluss an jeden Lauf durchgeführt um die Spezifität und Reinheit der Produkte zu überprüfen. Die Primereffizienz von allen Primerpaaren wurde in Vorversuchen unter Verwendung einer Verdünnungsreihe eines cDNA Pools getestet. Die Primer wurden nur verwendet, wenn die Primereffizienz über 1,95 (Idealwert 2,0 entspricht einer Verdopplung des PCR Produktes nach jedem Zyklus) lag. Die Cycle Treshold ( $C_t$ ) Werte wurden korrigiert durch die Haushaltsgene *VvUbiquitin1* (TC32075), *VvEF1- $\alpha$*  (EC959059) und *VvGAPDH* (CB973647) die bei verschiedenen Arten von biotischem und abiotischen Stress als sehr stabil exprimiert gezeigt wurden (Reid et al., 2006). Wenn alle drei Haushaltsgene zur Normalisierung verwendet wurden, wurde die Berechnung wie bereits beschrieben durchgeführt (Pfaffl et al., 2002). Die Analyse der Schmelzkurven, Messung der Primereffizienzen und Bestimmung der  $C_t$ -Werte sowie die Berechnung der mittleren normalisierten Expression der Gene wurden unter Verwendung der Rotor-Gene Q Series Software Q 2.0.2 (QIAGEN, Deutschland) und der Q-Gene Software (Müller et al., 2002) durchgeführt. Alle qPCR Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese und Bestimmung der Schmelzkurven am Ende jedes Laufes überprüft. Die amplifizierten Genprodukte wurden zusätzlich zur Sequenzierung an Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt.

## 6.4 RNA Techniken

### 6.4.1 Isolation von RNA aus Pflanzengewebe

Die RNA aus Beeren der Entwicklungsserie wurde nach dem bereits beschriebenen Protokoll isoliert (Downey et al., 2003b).

Die RNA aus Weinreben und Arabidopsis wurde mittels des EURx GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (Roboklon) nach Herstellerangabe isoliert.

### 6.4.2 RNA Quantifizierung

Die Konzentration und Qualität der RNA wurde durch Messung in einem Nanodrop (PEQLAB) überprüft. Zur Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration wurde die Lambert-Beer Gleichung  $E = \epsilon \times c \times b$  angewendet (c: Nukleinsäurekonzentration (ng/μl); E: Absorption;  $\epsilon$ : Extinktionskoeffizient (25 μl μg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> für RNA); b: Schichtdicke (cm)). Die Reinheit der RNA wurde durch Messung des OD260/OD280 Wertes kontrolliert, welcher zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

### 6.4.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung der RNA Qualität wurde eine Agarosegelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde ein 1,5 %-iges Agarosegel mit DEPC (Diethyldicarbonat) behandeltem Wasser hergestellt, zu dem nach dem Aufschmelzen der Agarose in der Mikrowelle noch 1,5 ml 20 x MOPS (0,4 M MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure), 0,1 M Natriumacetat, 20 mM EDTA, pH 7) und 5 ml 37 %-iges Formaldehyde gegeben wurden. Die RNA Proben wurden wie folgt vorbereitet: Zu 12,7 μl RNA wurden 3,3 μl 37 %-iges Formaldehyde, 1 μl 20 x MOPS, 2 μl RNA Ladepuffer (50 % Glycerin, 5 % 20 x MOPS, 1 % Bromphenolblau) und 1 μl Ethidiumbromid (0,5 mg/ml Stocklösung) gegeben. Anschließend wurde die RNA 10 min bei 65 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und bei 55 V für 1-2 h in 1x MOPS Laufpuffer aufgetrennt.

### 6.4.4 Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR)

Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurde das MAXIMA First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) nach Herstellervorgaben verwendet. 1 μg RNA wurde nach Protokoll in einem 20 μl Ansatz umgeschrieben und anschließend mit DEPC Wasser auf 50 μl aufgefüllt. Diese cDNA Stocklösung wurde bei -20 °C gelagert.

## 6.5 Pflanzentransformation

### 6.5.1 Biolistische Transformation (Gene Gun)

Ein transientes Expressionssystem unter Verwendung einer 'Chardonnay' Suspensionskultur wurde etabliert wie zuvor beschrieben (Bogs et al., 2007; Walker et al., 2007). Die Zellen wurden mit 1,6 µm Goldpartikeln (Bio-Rad) mittels der Genkanone Model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System (Bio-Rad) mit 4481 kPa Heliumdruck und einem Vakuum von 86 kPa bei einer Distanz von 9,5 cm beschossen. Die Goldpartikel wurden mit 50 ng Promotor DNA, 500 ng Effektor DNA und 100 ng Kontrollplasmid pRluc (Horstmann et al., 2004) DNA bis zu einer Gesamtmenge von 2 µg DNA beladen. Transformationen die weniger als 2 µg DNA enthielten wurden mit dem Leervektor (pART7) aufgefüllt um eine vergleichbare Beladung der Goldpartikel in allen Experimenten zu gewährleisten. Die beschossenen Zellen wurden 48 h nach der Transformation aufgeschlossen und die Aktivität der Luciferasegene bestimmt. Hierzu wurden 200 µl Zellen in einem eisgekühlten Mörser mit 200 µl 2 x Passive Lysis Buffer (PLB, Promega) versetzt und für 1,5 min gemörsert. Anschließend wurden die gemörserten Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 1-2 h auf Eis inkubiert und danach für 1 min bei 10000 Rpm die Zelltrümmer abzentrifugiert. Die Messung der Luciferaseaktivitäten im Überstand wurden mit dem Beetle Juice Kit und dem Renilla Glow Juice Kit (PJK, Deutschland) nach Herstellervorgaben durchgeführt. Die Lichtemission, hervorgerufen durch die Umsetzung der Substrate durch die beiden Luciferasegene, wurde in einem Lumat LB 9507 Luminometer (Berthold Technologies) gemessen. Die relative Luciferaseaktivität wurde als Verhältnis zwischen Firefly und Renilla (Kontrolle) Luciferase nach Abzug der Hintergrundaktivität der nicht beschossenen Zellen berechnet.

### 6.5.2 Elektrische Transformation (Elektroporation)

Für die transiente Transformation von Weinrebenprotoplasten der Sorte 'Chardonnay' wurde das Protokoll zur Transformation von Tabakprotoplasten (Foresti et al., 2006) mit den folgenden Modifikationen verwendet. Die 'Chardonnay' Suspensionskultur wurde 4-6 Tage nach der Subkultivierung bei 100 Rpm für 10 min abzentrifugiert. Nach der Resuspendierung in einer gleichen Menge TEX Puffer (B5 Basal Salts (Sigma), 500 mg/L MES, 750 mg/L CaCl<sub>2</sub>, 250 mg/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 137 g/L Sukrose, pH 5,7) ergänzt mit 0,2 % Macerozym 'Onozuka' R10 und 0,4 % Cellulase 'Onozuka' R10 (Yakult, Japan) wurden die Zellen auf Petrischalen aufgeteilt und die Zellwände für 14-18 h bei 25 °C im Dunkeln abverdaut. Anschließend wurde die Protoplastensuspension vorsichtig in 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 1:1 mit EP Puffer (137 g/L Sukrose, 2,4 g/L HEPES, 6 g/L KCl, 600 mg/L CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2) gemischt. Die Lösung wurde sanft vermischt und für 15 min bei 100 Rpm in

einem Ausschwingrotor ohne Bremse abzentrifugiert. Um die lebenden Protoplasten die auf der Oberfläche flotierten von den toten Protoplasten innerhalb der Lösung abzutrennen wurde mit einer Pasteurpipette an einer peristaltischen Pumpe vorsichtig die Lösung samt Pellet unter den Protoplasten abgesaugt. Diese Prozedur wurde in drei weiteren Waschschrritten mit EP Puffer wiederholt. Zum Schluss wurden die aufgereinigten Protoplasten in EP Puffer zu einer Konzentration von  $2-5 \times 10^6$  Protoplasten/ml aufgefüllt, vorsichtig resuspendiert und direkt für die Transformation verwendet. Für die Elektroporation wurden 500  $\mu$ l Protoplasten vorsichtig in eine 1 ml Einwegküvette pipettiert und mit 100  $\mu$ l DNA Lösung (30  $\mu$ g Promotor DNA, 30  $\mu$ g Effektor DNA und 1  $\mu$ g Kontrollvektor pRluc zur Normalisierung (Horstmann et al., 2004)) versetzt. Nach einer Inkubation von 5 min wurde die Elektroporation unter Verwendung von zwei Edelstahl Elektroden durch Anlegen von 1000  $\mu$ F und 160 V durchgeführt. Zwischen den einzelnen Transformationen wurden die Elektroden jedes mal mit destilliertem Wasser gespült, in 99 %-igen Ethanol getaucht, abgeflammt und anschließend in EP Puffer wieder abgekühlt. Nach 30 min Inkubation ohne Bewegung wurden die Protoplasten mit 2 ml TEX Puffer in 24-Well Platten überführt und für 24 h bei 25 °C im Dunkeln inkubiert.

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden 300  $\mu$ l Protoplasten mit 1700  $\mu$ l 250 mM NaCl vermischt und bei 100 Rpm für 2 min vorsichtig pelletiert. Das Pellet wurde dann mit 80  $\mu$ l 2 x Passive Lysis Buffer (PLB, Promega) lysiert und mit dem Beetle Juice Kit und dem Renilla Glow Juice Kit (PJK, Deutschland) nach Herstellervorgaben im Luminometer (Berthold) vermessen.

Bei Transformation der Protoplasten mit den *VRP1:GFP* Konstrukten, wurden die Protoplasten nach 48 h mikroskopiert (ZEISS SteREO Lumar).

## 6.5.3 Agrobakterien-vermittelte Transformation

### 6.5.3.1 Floral-Dip

Stabile Transformation von Arabidopsis Col-0 Wildtypen und *wrky33-1* Mutanten wurde nach der bereits beschriebenen Methode des Floral-Dip (Clough und Bent, 1998) mit einigen Modifikationen durchgeführt. Agrobakterien mit den entsprechenden Konstrukten wurde in 50 ml YEB Medium mit den entsprechenden Antibiotika für 16 h bei 28 °C und 200 Rpm bis zur stationären Phase wachsen gelassen. Mit dieser Starterkultur wurden anschließend zweimal 500 ml YEB Medium mit den entsprechenden Antibiotika ohne Rifampicin für die chromosomale Resistenz angesetzt und erneut bis zur stationären Phase wachsen gelassen. Nun wurden die Zellen für 5 min bei 5000 Rpm abzentrifugiert und das Pellet in DIP Medium ( $\frac{1}{2}$  MS Salze (Serva), 2 % Sukrose, pH 5,8 (mit 1 N KOH)) bis zu einer OD600 von 0,9 verdünnt. 200 ml Suspension wurden danach in 500 ml Weck® Gläser gefüllt und mit 0,05 % Silvet L-77 und 10  $\mu$ l/l BAP vermischt. Blühende Arabidopsis Pflanzen

wurden für 1 min in die Suspension getaucht und dabei leicht geschwenkt um die T<sub>0</sub> Generation zu erzeugen. Die Pflanzen wurden anschließend für 24 h in einer feuchten Kammer liegen gelassen um das Eindringen der Agrobakterien in die Blütenstände zu ermöglichen. 2 Wochen nach der Transformation wurden die Pflanzen nicht mehr gegossen um die Reifung und Trocknung der Samen zu gewährleisten. Nach weiteren 2-4 Wochen konnten schließlich die Samen geerntet werden. Die Selektion der transformierten T<sub>1</sub> Generation wurde auf Erde unter Verwendung von BASTA (0,02 % in Wasser) durchgeführt. Die Pflanzen wurden nach Vollentwicklung der Keimblätter (Kotyledonen) und Primärblätter (4-Blatt-Stadium) im Abstand von jeweils 3 Tagen 3 mal mit BASTA besprüht und die überlebenden Pflanzen zur Samenproduktion heranwachsen gelassen. Diese T<sub>2</sub> Generation wurde dann für die weiteren Versuche verwendet. Da nicht auf homozygote Pflanzen selektioniert wurde, wurden alle Pflanzen vor den Versuchen mittels PCR Schnelltest auf das Vorhandensein des Transgens getestet.

### 6.5.3.2 Vakuum Infiltration

Die transiente Expression von Resistenzgenen in Weinrebenblättern mittels Agrobakterien-vermittelter Vakuuminfiltration wurde in Zusammenarbeit mit Janine Höll (Dissertation J. Höll, 2014) auf Grundlage bereits beschriebener Methoden (Kapila et al., 1997) für die Weinrebe optimiert. Hierzu wurden Agrobakterien mit dem entsprechenden Vektor für 5 h bei 28 °C und 200 Rpm in 5 ml LB Medium mit passenden Antibiotika vorkultiviert. Mit der Vorkultur wurden anschließend 500 ml YEB Hauptkultur angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 200 Rpm wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 10 min bei 5000 Rpm abzentrifugiert und in MES Puffer (10 mM MES, pH 5,5) auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 verdünnt. Danach wurde Acetosyringon (4'-Hydroxy-3',5'-Dimethoxyacetophenon; 100 µM) zum MES Medium gegeben und die Zellen zur Virulenzsteigerung für 3 h bei 50 Rpm und 22 °C im Dunkeln vorsichtig geschüttelt. Acetosyringon ist ein Phytohormon das von verwundeten Pflanzenzellen sekretiert wird und dadurch zu einer gesteigerten Transformationseffizienz bei Agrobakterien-vermittelter Transformation in Pflanzen führt. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz in den infiltrierten Rebenblättern enthielt jede Transformation als interne Kontrolle die gleiche Menge Agrobakterien mit dem Plasmid pKGWFS7 (Karimi et al., 2002). Dieser binäre Vektor enthält ein gekoppeltes *GFP:GUS* Reporterkonstrukt unter der Kontrolle des CaMV35S Promotors und erlaubte dadurch eine Normalisierung der Transformationseffizienz relativ zur GFP Fluoreszenz oder zur GUS Aktivität. Die Transformationseffizienz selbst hängt maßgeblich von den eingesetzten Pflanzen ab. Letztendlich wurden zehn Wochen alte Gewächshaus Weinreben der Sorte `Shiraz` verwendet. Diese Pflanzen wurden kopfüber in 750 ml WECK® Gläser mit 400 ml Agrobakteriensuspension mit 0,01 % (v/v) Break-Thru S240 (AlzChem AG, Deutschland) zur Reduzierung der Oberflächenspannung getaucht.

Die Gläser mit den Pflanzen wurden auf einen Magnetrührer in einem Exsikkator gestellt und Vakuum (20-40 mmHg) mittels einer Vakuumpumpe (SC810, KNF Neuberger GmbH) für 5 min angelegt. Das anschließende schlagartige Belüften des Systems sorgte dafür, dass die Agrobakterien durch die Spaltöffnungen in die Blätter gesaugt wurden. Erfolgreich infiltrierte Blattbereiche konnten dadurch erkannt werden, dass durch den angefüllten Intrazellularraum die Blätter durchscheinend wurden. Hierdurch konnte optisch die Infiltrationseffizienz kontrolliert werden. Nach der Infiltration wurden äußerlich anhaftende Bakterien mit destilliertem Wasser abgespült und die Pflanzen zurück ins Gewächshaus gestellt. Hier konnten dann zu verschiedenen Zeitpunkten (24 bis 196 h) nach der Infiltration die Blätter 2 und 3 (von oben gezählt) abgeerntet werden. Der Hauptfokus der Untersuchungen wurde auf Blatt 2 gelegt, da hier die Transformationseffizienz durchgehend am Höchsten war.

Die *GFP* Fluoreszenz wurde ein bis sieben Tage nach Infiltration mit dem Stereomikroskop SteREO Lumar V12 (Zeiss) mit einem eGFP Filter (380 nm Anregung, 480 nm Emission) und als Kontrolle mit den FITC (Anregung 495 nm, Emission 519 nm) und Cy3 (550 nm Anregung, 570 nm Emission) Filtern beobachtet. Bilder wurden mittels der ZEN Imaging-Software (Zeiss) aufgenommen und ausgewertet.

## **6.6 Infektionen**

### **6.6.1 Falscher Mehltau**

#### **6.6.1.1 *Plasmopara viticola***

Von 10 verschiedenen 12 Wochen alten, 80 cm großen Weinreben wurden 10 Blattscheiben mit einem Durchmesser von 1,5 cm aus den Blättern 2 und 3 (gezählt von oben) ausgestanzt. Im Falle der infiltrierte Pflanzen wurden 3 Blattscheiben von drei genau definierten Bereichen ausgestanzt, die eine Transformationseffizienz von 90-100 % aufwiesen. Alle Blattscheiben wurden mit der Unterseite nach oben in Petrischalen auf feuchtes Filterpapier gelegt. Die Blattscheiben wurden mit einem einzelnen 50 µl Tropfen einer *P. viticola* Suspension mit einer Konzentration von 50.000 Sporangien/ml in destilliertem Wasser inokuliert. Nach einer Inkubation von 3 h im Dunkeln bei 22 °C wurden die Tropfen vorsichtig abgesaugt und die Blattscheiben unter der Sterilbank oberflächlich trocknen gelassen. Anschließend wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und in der Klimakammer bei 22 °C und 12 h / 12 h Licht / Dunkel Rhythmus für 7 Tage inkubiert. Diese Vorgehensweise wurde dreimal mit dem selben Feldisolat wiederholt, welches am DLR Rheinpfalz kultiviert wurde.

Das Ausmaß der Sporulation wurde nach 7 Tagen durch Auszählen der Sporangien pro Blattscheibe mittels eines Hämocytometers ausgewertet. Hierfür wurden die Blattscheiben einzeln in 1,5 ml

Reaktionsgefäße gegeben und die Sporangien durch Vortexen mit 1 ml Wasser und 0,01 % Tween-20 heruntergewaschen. Mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer wurden die Sporangien unter einem Mikroskop ausgezählt.

### **6.6.1.2 *Hyaloperonospora arabidopsidis***

Etwa 50 *Arabidopsis thaliana* Samen wurden in einem 9x9 cm Topf auf Erde in der Klimakammer für 2 Wochen im 22 °C / 20 °C Tag / Nacht und 12 h / 12 h Hell / Dunkel Rhythmus angezogen. Die Pflanzen wurden mit 3 Sprühstößen einer 50.000 Sporangien/ml Suspension inokuliert und über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen für weitere 7 Tage in der Klimakammer bei gleichen Bedingungen wachsen gelassen. Zur Auslösung der Sporulation wurden die Pflanzen erneut über Nacht in eine feuchte Kammer gestellt.

Das Ausmaß der Sporulation wurde nach 7 Tagen durch Auszählen der Sporangien pro g Frischgewicht mittels eines Hämozytometers ausgewertet. Hierfür wurden etwa 50 Pflanzen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und die Sporangien durch Vortexen mit 10 ml Wasser und 0,01 % Tween-20 heruntergewaschen. Mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer wurden die Sporangien unter einem Mikroskop ausgezählt.

## **6.6.2 Echter Mehltau**

### **6.6.2.1 *Erysiphe necator***

10 verschiedene 12 Wochen alte und 80 cm große Weinreben wurden durch Abklopfen der Sporen von vollständig infizierten Blättern infiziert und im Gewächshaus zwischen infizierten Pflanzen stehen gelassen. Nach 10 h wurden die Blätter 1 bis 4 abgeerntet und für die qPCR bei -80 °C eingefroren.

## **6.6.3 Grauschimmel**

### **6.6.3.1 *Botrytis cinerea***

*Arabidopsis* Pflanzen wurden für 5 Wochen auf 42 mm Jiff-7 Torfquellköpfen zur Vermeidung von Fremdinfectionen unter Langtagbedingungen in der Klimakammer wachsen gelassen (PGC, Bronson: 22 °C, 16 h Licht / 8 h Dunkel, 70 % Feuchtigkeit). Für die Inokulation der Pflanzen wurde ein Isolat

von Weintrauben benutzt, dass am DLR Rheinpfalz auf Malzagarplatten (2 % (w/v) Gerstenmalz) bei 22 °C kultiviert wurde. 10 Tage alte Sporen wurden durch Abspülen mit Traubensaft von den Agarplatten heruntergewaschen und auf eine Konzentration von 250.000 Sporen/ml eingestellt. Für die Tropfeninfektion wurden 3 µl Tropfen der Suspension auf einzelne abgetrennte Blätter in Petrischalen mit feuchten Filtern getropft. Die gleiche Sporensuspension wurden auch verwendet um Pflanzen mit 3 Sprühstößen zu infizieren. Während der gesamten Infektionsdauer wurden die Pflanzen bei hoher Luftfeuchtigkeit (>80 %) in einer feuchten Kammer innerhalb der Klimakammer gehalten. Das Ausmaß der Infektion wurde nach 5 bzw. 7 Tagen durch Auswertung der Läsionsgröße mit Hilfe der ImageJ Image Analysis Software (Schneider et al., 2012) bestimmt.

## 6.7 Bioinformatik

Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Primer3 Software (Koressaar und Remm, 2007) auf Grundlage der Weinsequenzen in der Genoscope (Centre National de Séquençage) Datenbank entworfen.

Die Sequenzen aller Klone wurden bestätigt durch Sequenzierung bei Eurofins MWG Operon, Deutschland.

Die Promotor Sequenzen wurden mit Hilfe der PLACE Datenbank (Higo et al., 1999) auf *cis*-Elemente hin untersucht.

WoLF PSORT (Horton et al., 2007) wurde zur Vorhersage der Proteinlokalisierung benutzt.

DNA Sequenzen wurden mittels des Clustal Omega Programms (Sievers et al., 2011) verglichen und im Clone Manager (Version 7) editiert.

Sequenzen in der EST Datenbank wurden unter Verwendung des BLAST Programms blastp (Altschul et al., 1990) gesucht.

Stammbäume wurden mit Hilfe der nachfolgenden GenBank Accession Nummern und der MEGA 5 Software (Tamura et al., 2011) erstellt: VvWRKY33, XP\_002264974.1 (KF800706);

AtWRKY33, AAM34736.1; VvWRKY2, AAT46067; VpWRKY2, ADD70008;

VvWRKY1, AAT90397; VvWRKY17, ACY25182 ; VpWRKY11, AFV70622;

VvWRKY11, ACY25182; VpWRKY1, ACY69975

## 7 Abkürzungen

%	Prozent
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
A.	Agrobacterium
A. tumefaciens	Agrobacterium tumefaciens
ABA	abscisic acid
At	Arabidopsis thaliana
A. thaliana	Arabidopsis thaliana
ATP	adenosine-5'-triphosphate
bp	Basenpaar
B. cinerea	Botrytis cinerea
BLAST	basic local alignment search tool
C-terminus	carboxy terminus
CaMV-35S	cauliflower mosaic virus 35S promotor
cDNA	complementary DNA
Col-0	Columbia zero ecotype of <i>Arabidopsis thaliana</i>
Ct	cycle threshold
cv.	Kultivar
d	Tag
dpi	Tage nach Infektion
dai	Tage nach Infiltration
DEPC	diethylpyrocarbonate
DLR	Dual-Luciferase Reportersystem
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DFIC	Dana-Farber Cancer Institute
E	Absorption
E. necator	Erysiphe necator
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EST	expressed sequence tag
Et	transformation efficiency
EtOH	Ethanol
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FLS	flavonol synthase

---

GC	Grape Cormier (medium)
GFP	green fluorescent protein
GUS	$\beta$ -glucuronidase
GSVIVT	Genoscope gene annotation identifier
h	hour
<i>H. arabidopsidis</i>	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>
hpi	Stunden nach Infektion
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IAA	indol-3-essigsäure
JA	jasmionic acid
Kb	kilo Basenpaar
kDa	kilo Dalton
kPa	kilo Pascal
l	Liter
L.	Linné
LB	Luria-Bertani (medium)
LAR	leucoanthocyanidin reductase
LUC	Luciferase
M	Molarität (1M= 1mol/l)
Md	<i>Malus x domestica</i>
MeJA	Methyljasmonat
MeOH	Methanol
MEGA	molecular evolutionary genetics analysis
MES	2-(N-morpholino) ethansulfonsäure
Min	Minute
MS	medium Murashige and Skoog medium
MYB	myeoblastosis
MOPS	3-(N-morpholino) propane-1-sulfonic acid
mRNA	messenger RNA
mV	milliVolt
MW	molecular weight
N	Normalität
N-terminus	amino terminus
NAA	2-(1-Naphthyl)acetic acid
n.d.	not detected
Nb	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NLS	nuclear localisation signal

---

Nt	Nicotiana tabacum
OD	optical density
ORF	open reading frames
P. viticola	Plasmopara viticola
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
pH	lat. pondus Hydrogenii
PN	‘Pinot Noir’
PN40024	‘Pinot Noir’ nearly homozygous genotype 40024
PLACE	Plant cis-acting regulatory DNA element database
PLB	Passive Lysis Buffer
PR5, PR10	pathogenesis related 5 / 10
R1, R2, R3 MYB	DNA binding repeats one, two, three
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
sec	second
SNPs	single nucleotide polymorphisms
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression medium
sp.	Species
spp.	species pluralis
ssp.	subspecies
TC	sequence Tentative consensus sequences
TAE	tris acetate EDTA buffer
TC	tentative consensus
T-DNA	transfer DNA
TE	tris-EDTA buffer
TF	Transkriptionsfaktor
TGI	Gene Index Project platform
Ti	tumor-inducing (plasmid)
UFGT	UDP-Glc:flavonoid-3-O-glucosyltransferase
UniProt	Universal Protein Resource
UTR	untranslated region
UV	ultraviolet (light)
V	Volt
v/v	volume per volume
var.	variety

Vp	Vitis pseudoreticulata
Vv	Vitis vinifera
VIVC	Vitis International Variety Catalogue
VvGI DFCI	Grape Gene Index
W	Watt
w/v	weight per volume
YEB	yeast extract with beef medium
$\epsilon$	wavelength-dependent extinction coefficient

## 8 Referenzen

- AbuQamar, S., Chen, X., Dhawan, R., Bluhm, B., Salmeron, J., Lam, S., Dietrich, R.A., and Mengiste, T.** (2006). Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in Arabidopsis response to Botrytis infection. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 48, 28-44.
- Akkurt, M., Welter, L., Maul, E., Töpfer, R., and Zyprian, E.** (2007). Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). *Mol Breeding* 19, 103-111.
- Ali, K., Maltese, F., Choi, Y., and Verpoorte, R.** (2010). Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochem Rev* 9, 357-378.
- Alleweldt, G., and Possingham, J.V.** (1987). Progress in grapevine breeding. *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 75, 669-673.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H., Zhu, S., Qiu, J.L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., et al.** (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *Embo J* 24, 2579-2589.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415, 977-983.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J.-M., and Pugin, A.** (2003). Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection Against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol Plant Microbe In* 16, 1118-1128.
- Baldwin, D.A., and Gurley, W.B.** (1996). Isolation and characterization of cDNAs encoding transcription factor IIB from *Arabidopsis* and soybean. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 10, 561-568.
- Birkenbihl, R.P., Diezel, C., and Somssich, I.E.** (2012). Arabidopsis WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiol* 159, 266-285.
- Blanc, S., Wiedemann-Merdinoglu, S., Dumas, V., Mestre, P., and Merdinoglu, D.** (2012). A reference genetic map of *Muscadinia rotundifolia* and identification of *Ren5*, a new major locus for resistance to grapevine powdery mildew. *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 125, 1663-1675.
- Blasi, P., Blanc, S., Wiedemann-Merdinoglu, S., Prado, E., Ruhl, E.H., Mestre, P., and Merdinoglu, D.** (2011). Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 123, 43-53.
- Bogs, J., Jaffe, F.W., Takos, A.M., Walker, A.R., and Robinson, S.P.** (2007). The grapevine transcription factor *VvMYBPA1* regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiol* 143, 1347-1361.

- Bostock, R.M.** (2005). Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annual review of phytopathology* *43*, 545-580.
- Brandizzi, F.** (2002). The Destination for Single-Pass Membrane Proteins Is Influenced Markedly by the Length of the Hydrophobic Domain. *Plant Cell* *14*, 1077-1092.
- Briesemeister, S., Rahnenfuhrer, J., and Kohlbacher, O.** (2010). YLoc--an interpretable web server for predicting subcellular localization. *Nucleic acids research* *38*, W497-502.
- Böhm, A., and Zyprian, E.** (1998). RAPD marker in grapevine (*Vitis* spp.) similar to plant retrotransposons. *Plant Cell Reports* *17*, 415-421.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y.** (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 7877-7882.
- Campos-de Quiroz, H.** (2002). Plant genomics: an overview. *Biological research* *35*, 385-399.
- Carimi, F., Barizza, E., Gardiman, M., and Schiavo, F.L.** (2005). Somatic embryogenesis from stigmas and styles of grapevine. *In Vitro Cell Dev-Pl* *41*, 249-252.
- Castelluci, G.F.** (2013). Statistical Report on vitiviniculture 2013, I.O.o.V.a. Wine, ed. (Paris).
- Castro, A.J., Carapito, C., Zorn, N., Magne, C., Leize, E., Van Dorsseleer, A., and Clement, C.** (2005). Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress. *Journal of experimental botany* *56*, 2783-2795.
- Chée, R., and Pool, R.M.** (1987). Improved Inorganic Media Constituents for *In Vitro* Shoot Multiplication of *Vitis*. *Sci Hortic-Amsterdam* *32*, 85-95.
- Chellemi, D.O., and Marois, J.J.** (1992). Influence of Leaf Removal, Fungicide Applications, and Fruit Maturity on Incidence and Severity of Grape Powdery Mildew. *Am J Enol Viticult* *43*, 53-57.
- Chen, C., and Chen, Z.** (2002). Potentiation of developmentally regulated plant defense response by *AtWRKY18*, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor. *Plant Physiol* *129*, 706-716.
- Chen, H., Huang, N., and Sun, Z.** (2006). SubLoc: a server/client suite for protein subcellular location based on SOAP. *Bioinformatics* *22*, 376-377.
- Chrisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J.** (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* *124*.
- Claverie, J.-M.** (1997). Computational methods for the identification of genes in vertebrate genomic sequences. *Human molecular genetics* *6*, 1735-1744.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* *16*, 735-743.
- Colas, S., Afoufa-Bastien, D., Jacquens, L., Clement, C., Baillieul, F., Mazeyrat-Gourbeyre, F., and Monti-Dedieu, L.** (2012). Expression and *in situ* localization of two major PR proteins of grapevine berries during development and after UV-C exposition. *PloS one* *7*, e43681.

- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., and Gerós, H.** (2007). Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. *Food I*, 1-22.
- Coombe, B.G.** (1992). Research on Development and Ripening of the Grape Berry. *Am J Enol Viticult* 43, 101-110.
- Czemmel, S., Stracke, R., Weisshaar, B., Cordon, N., Harris, N.N., Walker, A.R., Robinson, S.P., and Bogs, J.** (2009). The Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor *VvMYB1* Regulates Flavonol Synthesis in Developing Grape Berries. *Plant Physiol* 151, 1513-1530.
- Davies, C., and Robinson, S.P.** (2000). Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol* 122, 803-812.
- Delp, G., and Palva, E.T.** (1999). A novel flower-specific *Arabidopsis* gene related to both pathogen-induced and developmentally regulated plant  $\beta$ -1,3-glucanase genes. *Plant Mol Biol* 39.
- Després, C., Subramaniam, R., Matton, D.P., and Brisson, N.** (1995). The Activation of the Potato *PR-10a* Gene Requires the Phosphorylation of the Nuclear Factor PBF1. *The Plant Cell* 7, 589-598.
- Devaiah, B.N., Karthikeyan, A.S., and Raghothama, K.G.** (2007). WRKY75 Transcription Factor Is a Modulator of Phosphate Acquisition and Root Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143, 1789-1801.
- DeYoung, B.J., and Innes, R.W.** (2006). Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature immunology* 7, 1243-1249.
- Di Gaspero, G., Copetti, D., Coleman, C., Castellarin, S.D., Eibach, R., Kozma, P., Lacombe, T., Gambetta, G., Zvyagin, A., Cindric, P., et al.** (2012). Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 124, 277-286.
- Dieterich, C., Grossmann, S., Tanzer, A., Ropcke, S., Arndt, P.F., Stadler, P.F., and Vingron, M.** (2005). Comparative promoter region analysis powered by CORG. *BMC genomics* 6, 24.
- Do, C.B., and Cormier, F.** (1991). Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell Reports* 9, 500-504.
- Dorsey, M.J.** (1914). Pollen development in the grape with special reference to sterility. *Agricultural Experiment Station* 144.
- Doster, M.A., and Schnathorst, W.C.** (1985). Comparative Susceptibility of Various Grapevine Cultivars to the Powdery Mildew Fungus *Uncinula Necator*. *Am J Enol Viticult* 36, 101-104.
- Downey, M.O., Harvey, J.S., and Robinson, S.P.** (2003). Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Aust J Grape Wine Res* 9, 110-121.
- Durrant, W.E., and Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annual review of phytopathology* 42, 185-209.

- Eibach, R., and Töpfer, R.** (2003). Success in resistance breeding: "Regent" and its steps into the market, Vol 603, p. 687-691 (Kecskemet, Hungary: ISHS Acta Horticulturae).
- Ellis, J., Dodds, P., and Pryor, T.** (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol* 3, 278-284.
- Elmore, J.M., Lin, Z.J., and Coaker, G.** (2011). Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams. *Curr Opin Plant Biol* 14, 365-371.
- Eulgem, T.** (2005). Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci* 10, 71-78.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., and Somssich, I.E.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5, 199-206.
- Eulgem, T., and Somssich, I.E.** (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol* 10, 366-371.
- Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G., and Ausubel, F.M.** (2003). *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires *EDS4* and *PAD2*, but not *SID2*, *EDS5* or *PAD4*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 35, 193-205.
- Ferreira, R.B., Monteiro, S.S., Picara-Perreira, M.A., and Teixeira, A.R.** (2004). Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *Trends Biotech* 22, 168-173.
- Figueiredo, A., Fortes, A.M., Ferreira, S., Sebastiana, M., Choi, Y.H., Sousa, L., Acioli-Santos, B., Pessoa, F., Verpoorte, R., and Pais, M.S.** (2008). Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. *Journal of experimental botany* 59, 3371-3381.
- Figueiredo, A., Monteiro, F., Fortes, A.M., Bonow-Rex, M., Zyprian, E., Sousa, L., and Pais, M.S.** (2012). Cultivar-specific kinetics of gene induction during downy mildew early infection in grapevine. *Functional & integrative genomics* 12, 379-386.
- Fils-Lycaon, B.R., Wiersma, P.A., Eastwell, K.C., and Sautiere, P.** (1996). A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. *Plant Physiol* 111, 269-273.
- Fischer, B.M., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, K.J., Topfer, R., and Zyprian, E.M.** (2004). Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 108, 501-515.
- Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M.** (2000). *Arabidopsis* Ethylene-Responsive Element Binding Factors Act as Transcriptional Activators or Repressors of GCC Box-Mediated Gene Expression. *Plant Cell* 12, 393-404.
- Fung, R.W., Gonzalo, M., Fekete, C., Kovacs, L.G., He, Y., Marsh, E., McIntyre, L.M., Schachtman, D.P., and Qiu, W.** (2008). Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiol* 146, 236-249.

- Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojimal, K.** (1968). Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exp Cell Res* 50, 151-158.
- Gao, J., and Xu, D.** (2010). The Musite open-source framework for phosphorylation-site prediction. *BMC bioinformatics* 11 Suppl 12, S9.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M., and Rodriguez-Palenzuela, P.** (1998). Plant Defense Peptides. *Biopolymers* 47, 479-491.
- Genné, J.** (2012). Vergleich der Widerstandsfähigkeit gegenüber *Plasmopara viticola* bei anfälligen (Lemberger, Müller-Thurgau) und robusten Rebsorten (Regent, Pinotin). Bachelorarbeit. Dualer Studiengang B. Sc. Weinbau & Oenologie, Neustadt/Weinstraße.
- Giannakis, C., Bucheli, C.S., Skene, K.G.M., Robinson, S.P., and Scott, N.S.** (1998). Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defence against powdery mildew infection. *Aust J Grape Wine Res* 4, 14-22.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Metraux, J.P., Zhu, T., and Katagiri, F.** (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 34, 217-228.
- Gleave, A.P.** (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol Biol* 20, 1203-1207.
- Govrin, E.M., and Levine, A.** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology : CB* 10, 751-757.
- Grimplet, J., Hemert, J.V., Carbonell-Bejerano, P., Diaz-Riquelme, J., Dickerson, J., Fennell, A., Pezzotti, M., and Martinez-Zapater, J.M.** (2012). Comparative analysis of grapevine whole-genome gene predictions, functional annotation, categorization and integration of the predicted gene sequences. *BMC Research* 5, 1-10.
- Guillaumie, S., Mzid, R., Mechin, V., Leon, C., Hichri, I., Destrac-Irvine, A., Trossat-Magnin, C., Delrot, S., and Lauvergeat, V.** (2010). The grapevine transcription factor WRKY2 influences the lignin pathway and xylem development in tobacco. *Plant Mol Biol* 72, 215-234.
- Guo, C., Guo, R., Xu, X., Gao, M., Li, X., Song, J., Zheng, Y., and Wang, X.** (2014). Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family. *Journal of experimental botany*.
- Hardie, W.J., O'Brien, T.P., and Jaudzems, V.G.** (1996). Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape, *Vitis vinifera* L. *Aust J Grape Wine Res* 2, 97-142.
- He, M., Xu, Y., Cao, J., Zhu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Guan, X., Yang, Y., Xu, W., and Fu, Z.** (2013). Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection. *Protoplasma* 250, 129-140.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T.** (1999). Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic acids research* 27, 297-300.
- Höll, J.** (2014). The R2R3 MYB Transcription Factors VvMYB14 and VvMYB15 as Regulators of the Stilbene Biosynthesis in *Vitis vinifera*. Dissertation. In Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät (Heidelberg: Ruprecht - Karls - Universität).

- Höll, J., Vannozzi, A., Czemmel, S., D'Onofrio, C., Walker, A.R., Rausch, T., Lucchin, M., Boss, P.K., Dry, I.B., and Bogs, J. (2013). The R2R3-MYB Transcription Factors MYB14 and MYB15 Regulate Stilbene Biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell*, 1-15.
- Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T., and Chilton, M.D. (1986). The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of bacteriology* 168, 1291-1301.
- Horstmann, V., Huether, C.M., Jost, W., Reski, R., and Decker, E.L. (2004). Quantitative promoter analysis in *Physcomitrella patens*: a set of plant vectors activating gene expression within three orders of magnitude. *BMC Biotechnol* 4, 13.
- Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., and Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research* 35, W585-587.
- Hu, X., and Reddy, A.S.N. (1997). Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Mol Biol* 34, 949-959.
- Hunter, T., and Karin, M. (1992). The Regulation of Transcription by Phosphorylation. *Cell* 70, 375-387.
- Iacono, G.L., van den Bosch, F., and Gilligan, C.A. (2013). Durable Resistance to Crop Pathogens: An Epidemiological Framework to Predict Risk under Uncertainty. *PLoS Comput Biol* 9, 1-9.
- Jacobs, A.K., Dry, I.B., and Robinson, S.P. (1999). Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathol* 48, 325-336.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., and Characterization, T.F.-I.P.C.f.G.G. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449, 463-468.
- Jellouli, N., Ben Jouira, H., Skouri, H., Ghorbel, A., Gourgouri, A., and Mliki, A. (2008). Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress. *Journal of plant physiology* 165, 471-481.
- Jensen, L.J., Gupta, R., Blom, N., Devos, D., Tamames, J., Kesmir, C., Nielsen, H., Staerfeldt, H.H., Rapacki, K., Workman, C., et al. (2002). Prediction of Human Protein Function from Post-translational Modifications and Localization Features. *J Mol Biol* 319, 1257-1265.
- Jeong Mee Park, J.M., Park, C.-J., Lee, S.-B., Ham, B.-K., Shin, R., and Paek, K.-H. (2001). Overexpression of the Tobacco *Tsi1* Gene Encoding an EREBP/AP2-Type Transcription Factor Enhances Resistance against Pathogen Attack and Osmotic Stress in Tobacco. *Plant Cell* 13, 1035-1046.
- Jiang, Y., and Deyholos, M.K. (2008). Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant Mol Biol* 69, 91-105.
- Joshi, R.K., and Nayak, S. (2011). Review Functional characterization and signal transduction ability of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat resistance genes in plants. *Genet Mol Res* 10, 2637-2652.
- Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., and Angenon, G. (1997). An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci* 122, 101-108.

- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A.** (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7, 193-195.
- Kasprzewska, A.** (2003). Plant chitinases - regulation and function. *Cellular & molecular biology letters* 8, 809-824.
- Keen, N.T.** (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual review of genetics* 24, 447-463.
- Kim, M.J., Baek, K., and Park, C.M.** (2009). Optimization of conditions for transient *Agrobacterium*-mediated gene expression assays in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 28, 1159-1167.
- Kobel, F.** (1929). Die cytologischen und genetischen Voraussetzungen für die Immunitätszüchtung der Rebe. *Der Züchter* 1, 197-202.
- Koressaar, T., and Remm, M.** (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289-1291.
- Kortekamp, A.** (2006). Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 44, 58-67.
- Kunkel, B.N., and Brooks, D.M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 5, 325-331.
- Lai, Z., Li, Y., Wang, F., Cheng, Y., Fan, B., Yu, J.Q., and Chen, Z.** (2011). Arabidopsis sigma factor binding proteins are activators of the WRKY33 transcription factor in plant defense. *Plant Cell* 23, 3824-3841.
- Lebel, S., Schellenbaum, P., Walter, B., and Maillot, P.** (2010). Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family. *BMC plant biology* 10, 184.
- Lee, S.-Y., Choi, Y.-J., Ha, Y.-M., and Lee, D.-H.** (2007). Ectopic Expression of Apple *MbR7* Gene Induced Enhanced Resistance to Transgenic *Arabidopsis* Plant Against a Virulent Pathogen. *J Microbiol Biotechnol* 17, 130-137.
- Lee, S.-Y., and Lee, D.-H.** (2005). Expression of *MbR4*, a TIR-NBS Type of Apple *R* Gene, Confers Resistance to Bacterial Spot Disease in *Arabidopsis*. *J Plant Biol* 48, 220-228.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Pierre Rouzé, P., and Rombauts, S.** (2002). PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promotor sequences. *Nucleic acids research* 30, 325-327.
- Levadoux, L.** (1956). Les populations sauvages et cultivée de *Vitis vinifera* L. *Annales des Plantes* 1, 59-118.
- Li, C., Bai, Y., Jacobsen, E., Visser, R., Lindhout, P., and Bonnema, G.** (2006). Tomato defense to the powdery mildew fungus: differences in expression of genes in susceptible, monogenic- and polygenic resistance responses are mainly in timing. *Plant Mol Biol* 62, 127-140.
- Li, H., Xu, Y., Xiao, Y., Zhu, Z., Xie, X., Zhao, H., and Wang, Y.** (2010). Expression and functional analysis of two genes encoding transcription factors, *VpWRKY1* and *VpWRKY2*, isolated from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*. *Planta* 232, 1325-1337.

- Li, J., Brader, G., and Palva, E.T.** (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16, 319-331.
- Li, S., Fu, Q., Chen, L., Huang, W., and Yu, D.** (2011). *Arabidopsis thaliana* WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance. *Planta* 233, 1237-1252.
- Licausi, F., Giorgi, F.M., Zenoni, S., Osti, F., Pezzotti, M., and Perata, P.** (2010). Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera*. *BMC genomics* 11, 719.
- Lijavetzky, D., Carbonell-Bejerano, P., Grimplet, J., Bravo, G., Flores, P., Fenoll, J., Hellin, P., Oliveros, J.C., and Martinez-Zapater, J.M.** (2012). Berry flesh and skin ripening features in *Vitis vinifera* as assessed by transcriptional profiling. *PLoS one* 7, e39547.
- Liu, H., Yang, W., Liu, D., Han, Y., Zhang, A., and Li, S.** (2011). Ectopic expression of a grapevine transcription factor *VvWRKY11* contributes to osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular biology reports* 38, 417-427.
- Liu, J.-J., and Ekramoddoullah, A.K.M.** (2006). The family 10 of plant *pathogenesis-related proteins*: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol Mol Plant P* 68, 3-13.
- Lodhi, M.A., and Reisch, B.I.** (1995). Nuclear DNA content of *Vitis* species, cultivars, and other genera of the *Vitaceae*. *TAG Theor Appl Genet* 90, 11-16.
- Maeo, K., Hayashi, S., Kojima-Suzuki, H., Morikami, A., and Nakamura, K.** (2001). Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 65, 2428-2436.
- Maillot, P., Lebel, S., Schellenbaum, P., Jacques, A., and Walter, B.** (2009). Differential regulation of *SERK*, *LEC1-like* and *pathogenesis-related* genes during indirect secondary somatic embryogenesis in grapevine. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 47, 743-752.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L., and Dietrich, R.A.** (2001). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet* 26, 403-410.
- Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., and Zhang, S.** (2011). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 1639-1653.
- Marchive, C., Leon, C., Kappel, C., Coutos-Thevenot, P., Corio-Costet, M.F., Delrot, S., and Lauvergeat, V.** (2013). Over-expression of *VvWRKY1* in grapevines induces expression of jasmonic acid pathway-related genes and confers higher tolerance to the downy mildew. *PLoS one* 8, e54185.
- Marchive, C., Mzid, R., Deluc, L., Barrieu, F., Pirrello, J., Gauthier, A., Corio-Costet, M.F., Regad, F., Cailleateau, B., Hamdi, S., et al.** (2007). Isolation and characterization of a *Vitis vinifera* transcription factor, *VvWRKY1*, and its effect on responses to fungal pathogens in transgenic tobacco plants. *Journal of experimental botany* 58, 1999-2010.
- Martin, C., and Paz-Ares, J.** (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends Genet* 13, 67-73.

- Martin, G.B., Bogdanove, A.J., and Sessa, G.** (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual review of plant biology* 54, 23-61.
- Matsuda, S., Vert, J.P., Saigo, H., Ueda, N., Toh, H., and Akutsu, T.** (2005). A novel representation of protein sequences for prediction of subcellular location using support vector machines. *Protein science : a publication of the Protein Society* 14, 2804-2813.
- Menke, F.L.H., Champion, A., Kijne, J.W., and Memelink, J.** (1999). A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J* 18, 4455-4463.
- Merz, P.R., Moser, T., Höll, J., Buchholz, G., Kortekamp, A., Zyprian, E., and Bogs, J.** (2014). The Transcription Factor VvWRKY33 is Involved in the Regulation of Grapevine (*Vitis vinifera*) Defence against the Oomycete Pathogen *Plasmopara viticola*. Eingereicht bei *Physiologia Plantarum* 25032014.
- Meyers, B.C.** (2003). Genome-Wide Analysis of NBS-LRR-Encoding Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 809-834.
- Moffett, P., Farnham, G., Peart, J.R., and Baulcombe, D.C.** (2002). Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *EMBO J* 21, 4511-4519.
- Monteiro, S., Picara-Perreira, M.A., Loureiro, V.B., Teixeira, A.R., and Ferreira, R.B.** (2007). The diversity of pathogenesis-related proteins decreases during grape maturation. *Phytochemistry* 68, 416-425.
- Moroldo, M., Paillard, S., Marconi, R., Fabrice, L., Canaguier, A., Cruaud, C., De Berardinis, V., Guichard, C., Brunaud, V., Le Clainche, I., et al.** (2008). A physical map of the heterozygous grapevine 'Cabernet Sauvignon' allows mapping candidate genes for disease resistance. *BMC plant biology* 8, 66.
- Mosavi, L.K., Cammett, T.J., Desrosiers, D.C., and Peng, Z.Y.** (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein science : a publication of the Protein Society* 13, 1435-1448.
- Moser, T.** (2014). Untersuchung der transkriptionellen Regulation von Kandidatengenen der Pathogenabwehr gegen *Plasmopara viticola* in der Weinrebe. Dissertation. In Fakultät für Chemie und Biowissenschaften (Karlsruhe: Universität Karlsruhe (KIT)).
- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R., and Dobbie, Z.** (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* 32, 1372-1374, 1376, 1378-1379.
- Mullins, M.G., Bouquet, A., and Williams, L.E.** (1992). *Biology of the grapevine* (New York: Cambridge University Press).
- Muthmann, R.** (2007). The use of plant protection products in the European Union, N. Pierre, ed. (Luxembourg: Eurostat).
- Mzid, R., Marchive, C., Blancard, D., Deluc, L., Barrieu, F., Corio-Costet, M.F., Drira, N., Hamdi, S., and Lauvergeat, V.** (2007). Overexpression of VvWRKY2 in tobacco enhances broad resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Physiologia plantarum* 131, 434-447.

- Naoumkina, M.A., He, X., and Dixon, R.A.** (2008). Elicitor-induced transcription factors for metabolic reprogramming of secondary metabolism in *Medicago truncatula*. *BMC plant biology* 8, 132.
- Nürnbergger, T., and Scheel, D.** (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* 6, 372-379.
- Ohler, U., and Niemann, H.** (2002). Identification and analysis of eukaryotic promoters: recent computational approaches. *Trends Genet* 17, 56-60.
- Olmo, H.P.** (1971). *Vinifera Rotundifolia* Hybrids as Wine Grapes. *Am J Enol Viticult* 22, 87-91.
- Palmer, E., and Freeman, T.** (2004). Investigation into the use of C- and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays. *Comparative and functional genomics* 5, 342-353.
- Pandey, S.P., and Somssich, I.E.** (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol* 150, 1648-1655.
- Peart, J.R., Mestre, P., Lu, R., Malcuit, I., and Baulcombe, D.C.** (2005). NRG1, a CC-NB-LRR protein, together with N, a TIR-NB-LRR protein, mediates resistance against tobacco mosaic virus. *Current biology : CB* 15, 968-973.
- Pedersen, A.G., Baldi, P., Chauvin, Y., and Brunak, S.** (1999). The biology of eukaryotic promoter prediction - a review. *Comp Chem* 23, 191-207.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H.** (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* 8, 785-786.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* 30, 1-10.
- Pilati, S., Perazzoli, M., Malossini, A., Cestaro, A., Dematte, L., Fontana, P., Dal Ri, A., Viola, R., Velasco, R., and Moser, C.** (2007). Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at veraison. *BMC genomics* 8, 428.
- Pitzschke, A., and Hirt, H.** (2009). Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling. *Plant Physiol* 149, 606-615.
- Polesani, M., Bortesi, L., Ferrarini, A., Zamboni, A., Fasoli, M., Zadra, C., Lovato, A., Pezzotti, M., Delledonne, M., and Polverari, A.** (2010). General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC genomics* 11, 117.
- Polesani, M., Desario, F., Ferrarini, A., Zamboni, A., Pezzotti, M., Kortekamp, A., and Polverari, A.** (2008). cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC genomics* 9, 142.
- Pruss, G.J., Nester, E.W., and Vance, V.** (2008). Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* induces host defense and development-dependent responses in the infiltrated zone. *Mol Plant Microbe In* 21, 1528-1538.

- Qi, D., DeYoung, B.J., and Innes, R.W.** (2012). Structure-Function Analysis of the Coiled-Coil and Leucine-Rich Repeat Domains of the RPS5 Disease Resistance Protein. *Plant Physiol* 158, 1819-1832.
- Qi, D., and Innes, R.W.** (2013). Recent Advances in Plant NLR Structure, Function, Localization, and Signaling. *Frontiers in immunology* 4, 348.
- Qiu, J.L., Fiil, B.K., Petersen, K., Nielsen, H.B., Botanga, C.J., Thorgrimsen, S., Palma, K., Suarez-Rodriguez, M.C., Sandbech-Clausen, S., Lichota, J., et al.** (2008). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *Embo J* 27, 2214-2221.
- Quackenbush, J., Liang, F., Holt, I., Pertea, G., and Upton, J.** (2000). The TIGR gene indices: reconstruction and representation of expressed gene sequences. *Nucl Acids Res* 28, 141-145.
- Rairdan, G.J., Collier, S.M., Sacco, M.A., Baldwin, T.T., Boetrich, T., and Moffett, P.** (2008). The coiled-coil and nucleotide binding domains of the Potato Rx disease resistance protein function in pathogen recognition and signaling. *Plant Cell* 20, 739-751.
- Riaz, S., Tenscher, A.C., Ramming, D.W., and Walker, M.A.** (2011). Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *TAG Theor Appl Genet* 122, 1059-1073.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., et al.** (2000). Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science* 290, 2105-2110.
- Riechmann, J.L., and Meyerowitz, E.M.** (1998). The AP2/EREBP Family of Plant Transcription Factors. *Biol Chem* 379, 633-646.
- Robert, N., Ferran, J., Breda, C., Coutos-Thévenot, P., Boulay, M., Buffard, D., and Esnault, R.** (2001). Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *pti*: Expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *Eur J Plant Pathol* 197, 249-261.
- Robinson, S.P., Jacobs, A.K., and Dry, I.B.** (1997). A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiol* 114, 771-778.
- Robinson, S.P., and Davies, C.** (2000). Molecular biology of grape berry ripening. *Aust J Grape Wine Res* 6, 175-188.
- Roeder, R.G.** (1991). The complexity of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biotech* 16, 402-408.
- Rushton, P.J., and Somssich, I.E.** (1998). Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr Opin Plant Biol* 1, 311-315.
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., and Somssich, I.E.** (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes. *Embo J* 15, 5690-5700.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., and Hunt, M.D.** (1996). Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.

- Ryu, H.S., Han, M., Lee, S.K., Cho, J.I., Ryoo, N., Heu, S., Lee, Y.H., Bhoo, S.H., Wang, G.L., Hahn, T.R., *et al.* (2006). A comprehensive expression analysis of the WRKY gene superfamily in rice plants during defense response. *Plant Cell Reports* 25, 836-847.
- Saleh, A., and Pagés, M. (2003). Plant AP2/ERF Transcription Factors. *Genet* 35, 37-50.
- Salzman, R.A., Tikhonova, I., Bordelon, B.P., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (1998). Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol* 117, 465-472.
- Santos-Rosa, M., Poutaraud, A., Merdinoglu, D., and Mestre, P. (2008). Development of a transient expression system in grapevine via agro-infiltration. *Plant Cell Reports* 27, 1053-1063.
- Scalabrin, S., Troggio, M., Moroldo, M., Pindo, M., Felice, N., Coppola, G., Prete, G., Malacarne, G., Marconi, R., Faes, G., *et al.* (2010). Physical mapping in highly heterozygous genomes: a physical contig map of the Pinot Noir grapevine cultivar. *BMC genomics* 11, 204.
- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vögeli, U., and Boller, T. (1986). Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324, 365-367.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* 9, 671-675.
- Schwander, F., Eibach, R., Fechter, I., Hausmann, L., Zyprian, E., and Topfer, R. (2012). *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 124, 163-176.
- Shelenkov, A., and Korotkov, E. (2009). Search of regular sequences in promoters from eukaryotic genomes. *Computational biology and chemistry* 33, 196-204.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., *et al.* (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7, 539.
- Singh, K.B. (1998). Transcriptional Regulation in Plants: The Importance of Combinatorial Control. *Plant Physiol* 118, 1111-1120.
- Solano, R., Nieto, C., Avila, J., Canas, L., Diaz, I., and Paz-Ares, J. (1995). Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *EMBO J* 14, 1773-1784.
- Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A., and Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocols* 1, 2019-2025.
- Staudt, G., and Kassemeyer, H.H. (1995). Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis* species. *Vitis* 34, 225-228.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., and Fritig, B. (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75, 687-706.

- Terral, J.F., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., Picq, S., Chevance, J.B., Jung, C., Fabre, L., et al.** (2010). Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of botany* 105, 443-455.
- Tamayo, M.C., Rufat, M., Bravo, J.M., and Segundo, B.S.** (1999). Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae. *Planta* 211, 62-71.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S.** (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28, 2731-2739.
- Tang, H., Ren, Z., and Krczal, G.** (2000). An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 19, 881-887.
- Tattersall, D.B., van Heeswijk, R., and Hoj, P.B.** (1997). Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiol* 114, 759-769.
- Terrier, N., Glissant, D., Grimplet, J., Barrieu, F., Abbal, P., Couture, C., Ageorges, A., Atanassova, R., Leon, C., Renaudin, J.P., et al.** (2005). Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta* 222, 832-847.
- This, P., Lacombe, T., and Thomas, M.R.** (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet* 22, 511-519.
- Thomas, M.R., Matsumoto, S., Cain, P., and Scott, N.S.** (1993). Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 86, 173-180.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Tierens, K.F., and Broekaert, W.F.** (1999). Requirement of functional *ethylene-insensitive 2* gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* 121, 1093-1102.
- Torregrosa, L., Verriès, C., and Tesnière, C.** (2002). Grapevine (*Vitis vinifera* L.) promoter analysis by biolistic-mediated transient transformation of cell suspensions. *Vitis* 41, 27-32.
- Torres, M.d., Sanchez, P., Fernandez-Delmond, I., and Grant, M.** (2003). Expression profiling of the host response to bacterial infection: the transition from basal to induced defence responses in *RPM1*-mediated resistance. *The Plant J* 33, 665-676.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., and Katagiri, F.** (2009). Network properties of robust immunity in plants. *PLoS genetics* 5, e1000772.
- Ulker, B., and Somssich, I.E.** (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol* 7, 491-498.
- Unger, S., Buche, C., Boso, S., and Kassemeyer, H.H.** (2007). The Course of Colonization of Two Different *Vitis* Genotypes by *Plasmopara viticola* Indicates Compatible and Incompatible Host-Pathogen Interactions. *Phytopathology* 97, 780-786.

- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., and Rozen, S.G.** (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* *40*, e115.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., Fitzgerald, L.M., Vezzulli, S., Reid, J., et al.** (2007). A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PloS one* *2*, e1326.
- Viklund, H., and Elofsson, A.** (2008). OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar. *Bioinformatics* *24*, 1662-1668.
- Vivier, M.A., and Pretorius, I.S.** (2000). Genetic Improvement of Grapevine: Tailoring Grape Varieties for The Third Millennium -A Review. *S Afr J Enol Vitic* *21*, 5-26.
- Vom Endt, D., Kijne, J.W., and Memelink, J.** (2002). Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry* *61*, 107-114.
- Walker, A.R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D.A., Thomas, M.R., and Robinson, S.P.** (2007). White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant journal : for cell and molecular biology* *49*, 772-785.
- Wang, W., Zhang, Y., Wen, Y., Berkey, R., Ma, X., Pan, Z., Bendigeri, D., King, H., Zhang, Q., and Xiao, S.** (2013). A comprehensive mutational analysis of the *Arabidopsis* resistance protein RPW8.2 reveals key amino acids for defense activation and protein targeting. *Plant Cell* *25*, 4242-4261.
- Welter, L.** (2008). Genetic and molecular analysis of Mildew disease resistance in grapevine. Dissertation. In Fakultät für Chemie und Biowissenschaften (Karlsruhe: University Karlsruhe (KIT)).
- Welter, L., Eibach, R., Töpfer, R., and Zyprian, E.** (2008). Untersuchungen potentieller Mehlauresistenzgene der Weinrebe. *Deutsches Weinbau Jahrbuch*, Vol **59** pp. 66-71 (Stuttgart (Hohenheim): Eugen Ulmer KG).
- Wilson, J.H.** (2003). Pointing fingers at the limiting step in gene targeting. *Nat Biotech* *21*, 759-760.
- Yamamoto, S., Nakano, T., Suzuki, K., and Shinshi, H.** (2004). Elicitor-induced activation of transcription via W box-related *cis*-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco. *Biochimica et biophysica acta* *1679*, 279-287.
- Yang, P., Chen, C., Wang, Z., Fan, B., and Chen, Z.** (1999). A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *The Plant J* *18*, 141-149.
- Yu, C.S., Lin, C.J., and Hwang, J.K.** (2004). Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on *n*-peptide compositions. *Protein science : a publication of the Protein Society* *13*, 1402-1406.
- Yu, D., Chen, C., and Chen, Z.** (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell* *13*, 1527-1540.
- Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S.C., Ester, M., Foster, L.J., et al.** (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* *26*, 1608-1615.

- 
- Zhang, C.Q., Xu, Y., Lu, Y., Yu, H.X., Gu, M.H., and Liu, Q.Q.** (2011). The WRKY transcription factor *OsWRKY78* regulates stem elongation and seed development in rice. *Planta* 234, 541-554.
- Zheng, Z., Mosher, S.L., Fan, B., Klessig, D.F., and Chen, Z.** (2007). Functional analysis of Arabidopsis WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BMC plant biology* 7, 2.
- Zheng, Z., Qamar, S.A., Chen, Z., and Mengiste, T.** (2006). Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 48, 592-605.
- Zhu, Z., Shi, J., Cao, J., He, M., and Wang, Y.** (2012). *VpWRKY3*, a biotic and abiotic stress-related transcription factor from the Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*. *Plant Cell Reports* 31, 2109-2120.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T.** (2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through *flagellin* perception. *Nature* 428, 764-767.
- Zohary, D.** (2004). Unconscious selection and the evolution of domesticated Plants. *Eco Botany* 58, 5-10.
- Zottini, M., Barizza, E., Costa, A., Formentin, E., Ruberti, C., Carimi, F., and Lo Schiavo, F.** (2008). Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. *Plant Cell Reports* 27, 845-853.

## 9 Eigene Publikationen

T. Moser, **P.R. Merz**, J. Bogs und E. Zyprian (2014). VvERF5 is involved in the regulation of grapevine (*Vitis vinifera*) defence against *Plasmopara viticola*. In Vorbereitung.

**P.R. Merz**, T. Moser, J. Höll, A. Kortekamp, G. Buchholz, E. Zyprian und J. Bogs (2014). The transcription factor VvWRKY33 is involved in the regulation of grapevine (*Vitis vinifera*) defence against the oomycete pathogen *Plasmopara viticola*. Eingereicht bei New Phytologist, 25.02.2014.

C. Luo, **P.R. Merz**, Y. Chen, E. Dickes, A. Pscherer, D. Schadendorf und S.B. Eichmüller (2013). MiR-101 inhibits melanoma cell invasion und proliferation by targeting MITF und EZH2. Cancer Letters 341 (2013) 240–247.

C. Luo, P.W. Tetteh, **P.R. Merz**, E. Dickes, A. Abukiwan, A. Hotz-Wagenblatt, S. Hollund-Cunz, T. Sinnberg, B. Schitteck, D. Schadendorf, S. Diederichs und S.B. Eichmüller (2012). miR-137 Inhibits the Invasion of Melanoma Cells through Downregulation of Multiple Oncogenic Target Genes. Journal of Investigative Dermatology (2012), Volume 133.

L. Dietz, A. Bosque, P. Pankert, S. Ohnesorge, **P. Merz**, A. Anel, M. Schnölzer und H.J. Thierse (2009). Quantitative DY-maleimide-based proteomic 2-DE-labeling strategies using human skin proteins. Proteomics 2009, 9, 1–11.

## **10 Danksagungen**

Zuerst möchte ich mich persönlich bei Herr Prof. Dr. Thomas Rausch bedanken, dass er mir die Möglichkeit eröffnet hat, mein sehr vielfältiges Projekt bei ihm in der Arbeitsgruppe Rausch abzuleisten und für die Übernahme des Amtes als Erstgutachter. Ich möchte mich für die Unterstützung in den TAC Meetings und Arbeitsgruppenseminaren sowie das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Weiter geht ein besonderer Dank an Prof. Dr. Jochen Bogs der mich vor allem zu Beginn, aber auch während der gesamten Zeit betreut und angeleitet hat. Danke für dieses interessante Arbeitsthema und die Übernahme des Zweitgutachtens. Ich bedanke mich sehr für seine Unterstützung, die interessanten Diskussionen und die Freiräume für eigene Entscheidungen. Einen besseren Betreuer hätte ich mir nicht vorstellen können!

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Sabine Strahl für die tollen Hinweise und angeregten Diskussionen während meiner TAC-Meetings, sowie im COS-Seminar danken. Prof. Dr. Oliver Gruss und Prof. Dr. Karin Schumacher danke ich für die Bereitschaft als weitere Mitglieder im Prüfungskomitee zu fungieren.

Prof. Eva Zyprian und Tina Moser (PhD) danke ich für die gute Zusammenarbeit im Projekt und bei der Veröffentlichung unseres gemeinsamen Papers. Dr. Günther Buchholz und Dr. Andreas Kortekamp sowie ihren gesamten Arbeitsgruppen (besonders Christine und Martina) für die produktive Zusammenarbeit und tolle Zeit in Neustadt.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der ehemaligen Flavo-Gruppe bedanken, die mir ermöglicht hat Einblicke in die Welt des Phenylpropanoidstoffwechsels zu bekommen. Zu nennen sind hier Stefan, Simon, Janine, Janina, Conny und Moni. Vielen Dank auch an Angelika für die Bewältigung des Verwaltungsaufwandes und die lieben Gespräche sowie den Rest der AG Rausch für die interessanten Seminare. Danke an Tanja die mir interessante Anreize für meine Arbeit gegeben hat.

Natürlich möchte ich mich auch bei Claudia Vogel und Anja Amrell bedanken, die mir im Labor mit Rat und Tat zur Seite standen und alles am Laufen hielten.

Doch mein weitaus größter Dank geht an meine Familie. Allen voran meine Frau Verena mit unseren Kindern Emilia und Moritz, die mich während meiner gesamten Doktorarbeit immer unterstützt und versorgt hat und für mich da war sowie bei meiner Mama für die fortwährende Unterstützung bei Allem. Ein ganz lieber Dank auch an meine Schwiegereltern für ihre Hilfe.

