

Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**“Entwicklung molekularer Selektionsmarker für Mehltaresistenz zur
effektiven Unterstützung der Züchtung von Qualitätshopfen
(*Humulus lupulus* L.)“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von

Dipl. Ing. agr. Rebecca Seidenberger
geb. am 16.12.1977 in Freising

Gutachter: 1. Prof. Dr. habil W. E. Weber
2. Prof. Dr. K. Pillen
3. Dr. habil V. Mohler

Verteidigung am: 17.12.2012

Halle / Saale 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Geschichte und Bedeutung des Hopfens	1
1.2	Biologie des Hopfens (<i>Humulus lupulus</i>)	2
1.3	Biologie und Bedeutung des Echten Mehltaus bei Hopfen	4
1.4	Resistenz und Resistenzzüchtung beim Hopfen gegenüber dem Echten Mehltau	6
1.5	Molekulare Marker	10
1.5.1	AFLP-Marker	12
1.5.2	Mikrosatelliten	12
1.6	Expressionsanalysen	13
1.7	Ziel dieser Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Pflanzenmaterial – Wildhopfen als neue genetische Ressource für die Mehltauresistenzzüchtung	15
2.2	Kartierungspopulationen zur Identifizierung von Mehlttauresistenzmarkern	16
2.3	<i>In vitro</i> -Vermehrung	19
2.4	Inokulation	20
2.4.1	Mehltauinokulation der Kartierungspopulation	20
2.4.2	Mehltauinokulation im Rahmen der Expressionsanalyse	23
2.4.2.1	Erster Versuch: Inokulation von <i>in vitro</i> -Pflanzen der Kreuzung Opal x WH18/97/003	23
2.4.2.2	Zweiter Versuch: Inokulation von im Gewächshaus angezogenen Wildhopfen WH18/97/003 und WH18/97/009	23
2.5	Molekularbiologische Arbeiten	24
2.5.1	Isolation von genomischer DNA	24
2.5.2	Isolation und Reinigung von RNA	25
2.5.2.1	Präparation von RNA aus Hopfenblättern	25
2.5.2.2	DNase-Verdau	25
2.5.2.3	RNA-Aufreinigung	26
2.5.3	cDNA-Synthese	26
2.5.3.1	Erststrangsynthese	26
2.5.3.2	Zweitstrangsynthese	27

2.5.3.3	cDNA-Reinigung	27
2.5.4	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	28
2.5.5	Markeranalysen	28
2.5.5.1	AFLP-Marker	28
2.5.5.2	SSR-Marker	31
2.5.5.3	Identifizierung molekularer Marker nach dem Prinzip der „Bulked-Segregant-Analyse“	32
2.5.6	Gelelektrophoretische Methoden	32
2.5.6.1	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA	32
2.5.6.2	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von cDNA	33
2.5.6.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	33
2.5.7	Detektion und Fragmentanalyse	33
2.6	Datenauswertung	34
2.6.1	Molekulargenetische Kartierung	34
2.7	Fragmentanalyse	35
2.7.1	Fragmentisolation	35
2.7.2	Klonierung von cDNA-AFLP-Fragmenten	35
2.8	Ableitung genomischer Marker aus cDNA-AFLP-Markern	36
2.9	DNA Sequenzierung und Sequenzanalyse	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Resistenzscreening und Spaltungsanalyse der Kartierungspopulationen	38
3.2	Identifizierung molekularer Mehltaresistenzmarker beim Hopfen	42
3.2.1	Molekulare Analyse zur Identifizierung von Mehltaresistenzmarkern	43
3.2.1.1	Identifizierung von AFLP-Markern für das Resistenzgen <i>R_{WH18}</i>	43
3.2.1.2	Identifizierung von AFLP-Markern für das Resistenzgen <i>R_{JAP-C845}</i> in der Kartierungspopulation WH18/97/008 x 92/076/721 (<i>R_{JAP-C845}</i>)	45
3.2.1.3	AFLP-Marker für die Resistenzgene <i>R_{WH18}</i> und <i>R₂</i> in der Kreuzung Wye Target x WH18/97/003	48
3.2.1.4	AFLP-Marker für das Resistenzgen von <i>R_{WH18}</i> und <i>R_{JAP-C845}</i> in der Kreuzung WH18/97/008 x 92/076/721	49
3.2.2	Verifizieren der WH18-Resistenzmarker in weiteren WH18-tragenden Zuchtstämmen	49
3.4	AFLP-Analyse und genetische Kartierung der Hallertauer Gold x WH18/97/003 Population	51

3.4.1	Genetische Kartierung	51
3.4.2	Identifizierung molekularer Geschlechtsmarker beim Hopfen in der Kartierungspopulation Hallertauer Gold x WH18/97/003	56
3.5	AFLP-Analyse und genetische Kartierung der Wye Target x WH18/97/003 Population	59
3.6	Differentielle Banden über cDNA-AFLPs	65
3.6.1	Erster Versuch: Inokulation von <i>in vitro</i> - Pflanzen der Kreuzung Opal x WH18/97/003 (T1, T2, T4 und T9)	65
3.6.2	Zweiter Versuch: Inokulation von im Gewächshaus angezogenen Wildhopfen WH18/97/003 und WH18/97/006	67
3.6.3	Resistenzassoziierte Marker	70
3.7	Ableitung von genomischen Selektionsmarkern aus polymorphen Transkripten	74
4	Diskussion	76
4.1	Kreuzungseltern	76
4.2	Phänotypische und genetische Fakten der Mehltaresistenz bei Hopfen	78
4.3	Molekulare Marker und genetische Kartierung	82
4.3.1	Molekulare Marker	82
4.3.1.1	Resistenzmarker für die Resistenzgene <i>R_{WH18}</i> und <i>R_{JAP-C845}</i>	82
4.3.1.2	Geschlechtsmarker beim Hopfen	86
4.3.2	Genetische Kartierung	88
4.4	cDNA-AFLP als Methode zur Darstellung differentieller Genexpression	95
4.4.1	Darstellung pilzlicher Gene mittels cDNA-AFLP nach Inokulation von Hopfenblättern mit <i>Podosphaera macularis</i> ssp. <i>humuli</i>	99
4.4.2	Als cDNA-AFLP exprimierte Gene von Hopfen nach Inokulation mit <i>Podosphaera macularis</i> ssp. <i>humuli</i>	99
4.4.2.1	Enzyme des antioxidativen Systems	101
4.4.2.2	Glykoproteine	102
4.4.2.3	An Stressreaktionen beteiligte Gene	102
4.4.2.4	An Abwehrreaktionen gegenüber verschiedenen Pilzen beteiligte Gene	103
4.5	Ausblick	104
5	Zusammenfassung	108
6	Summary	110
7	Literatur	112

8	Anhang	127
8.1	Chemikalienverzeichnis	127
8.2	Basislösungen	129
8.3	Abkürzungen	132
8.4	Liste der TDF-Sequenzen	135

1 Einleitung

1.1 Geschichte und Bedeutung des Hopfens

Die Urheimat des Hopfens wird in den feuchten Bergtälern im vorderen Asien vermutet. Der Hopfen fand bereits bei den Kulturvölkern der Babylonier und Ägypter als aromatische Pflanze Verwendung (Heyland et al., 2006). Der Hopfenanbau in Deutschland wurde mit großer Wahrscheinlichkeit zur Zeit der Völkerwanderung von den Wenden eingeführt. Die erste urkundliche Erwähnung des Hopfenanbaus stammt aus dem Jahre 736 (Kohlmann und Kastner, 1975). Kriegsgefangene Wenden sollen im Raum der heutigen Hallertau Hopfengärten angelegt haben. Der erste Hopfenanbau in England fand wesentlich später statt als auf dem Festland Europas. Flämische Auswanderer brachten zu Beginn des 16. Jahrhunderts den Hopfen nach England und verbreiteten dort seinen Anbau. Im 17. Jahrhundert wurde der Kulturhopfen durch Siedler in Amerika eingeführt. Die erste Kultivierung in Hopfengärten fand dort im darauffolgenden Jahrhundert statt. 1516 erließ der bayerische Herzog Wilhelm IV. eine Brauordnung mit dem sogenannten „Reinheitsgebot“. Darin ist bestimmt, dass zur Bierherstellung ausschließlich Hopfen, Malz, Hefe und Wasser eingesetzt werden dürfen. Dieses Reinheitsgebot ist bis heute gültig.

Hopfen wird heute in mehr als 50 Ländern der Erde kultiviert. Auf Grund der Tageslänge ist der Hopfenanbau auf Gebiete zwischen dem 35. und 55. Breitengrad der Nord- und Südhalbkugel beschränkt (Neve, 1991). Die Gesamtfläche des Hopfenanbaus weltweit beträgt aktuell 48.993 ha (Cooberg und Gehde, 2011), wobei Deutschland und die USA 2/3 des gesamten Welthopfens produzieren. Der Hopfenanbau in Deutschland umfasste 2011 eine Fläche von 18.228 ha (Cooberg und Gehde, 2011). Das größte Hopfengebiet ist mit 15.229 ha die Hallertau in Bayern, aber auch in Spalt (Bayern), im Gebiet um Tett nang (Baden-Württemberg) sowie in Thüringen, Sachsen und Sachsen-Anhalt (Elbe-Saale-Gebiet) wird Hopfen angebaut.

Hopfen wird heute fast ausschließlich für die Bierherstellung verwendet, die weltweit etwa 1,84 Milliarden hl (Barth Bericht, 2010/2011) umfasst. Die Hopfeninhaltsstoffe verleihen dem Bier sein spezifisches Aroma und einen herb-bitteren Geschmack. Des Weiteren tragen die Gerbstoffe und die Bitterstoffe aufgrund ihrer antiseptischen Wirkung zur Konservierung bei, was für die Haltbarkeit des Bieres von Bedeutung ist. Der Zusatz von Hopfen soll auch die

Eiweißfällung und die Schaumbildung des Bieres verbessern (Heyland et al., 2006). Auf Grund seiner sedativen, antibiotischen und östrogenen Wirkung der in den Hopfenzapfen (*Humuli strobulus*) bzw. in den Hopfendrüsen (*Glandula lupuli*) enthaltenen Wirkstoffe, wird der Hopfen auch als Arzneipflanze in der pharmazeutischen Industrie verwendet (Teuscher, 1997). In den letzten Jahren stellte sich weiterhin heraus, dass Hopfen eine Vielzahl an nieder- und höhermolekularen Polyphenolen und insbesondere das prenylierte Chalcon Xanthohumol enthält. Neben den vielen positiven gesundheitlichen Eigenschaften von Polyphenolen (Flavonoiden) ist Xanthohumol am interessantesten auf Grund seines antikanzerogenen Potentials (Biendl, 2005/2006). So dürfte der Anteil des Hopfens im pharmazeutisch-medizinischen Bereich in der Zukunft wachsen.

1.2 Biologie des Hopfens (*Humulus lupulus*)

Der Hopfen (*Humulus lupulus* L.) und der Hanf (*Cannabis sativa* L.) stellen die beiden landwirtschaftlich bedeutendsten Arten der Familie der Hanfgewächse (Cannabaceae) dar.

Der Hopfen ist diözisch (zweihäusig), d.h., dass jede Pflanze entweder nur männliche oder nur weibliche Blüten trägt. Selten sind auch beide Blütenarten an einer Pflanze zu beobachten, allerdings sind diese Zwitterpflanzen meist steril. Von wirtschaftlichem Nutzen sind die Dolden, die sich aus den weiblichen Blüten entwickeln. Die Dolden beinhalten die brautechnisch wertvollen Bitterstoffe (15 – 25 % der TM) und ätherische Öle (0,5 – 2,5 % der TM) die am Grund der Doldenblätter in Lupulindrüsen synthetisiert und gespeichert werden sowie die Gerbstoffe (2 – 6 % der TM), die in den Stielen, Spindeln und Blättern der Dolden enthalten sind. Die Bitterstoffe werden in α -Säuren (Humulone), β -Säuren (Lupulone) und δ -Säuren (Hupulone) unterteilt. Die größte Bedeutung für die Beurteilung des Brauwertes spielen die α -Säuren, die vor allem aus Humulon, Cohumulon und Adhumulon bestehen (Teuscher, 1997). Die männlichen Pflanzen spielen nur bei der Züchtung neuer Sorten eine Rolle, da sie nur sehr wenige Lupulindrüsen besitzen. Um eine Windbestäubung der weiblichen Blüten durch die männlichen Pollen zu verhindern, müssen die männlichen Pflanzen aus den kommerziellen Hopfenanbaugebieten entfernt werden. Aus befruchteten weiblichen Blüten würden sich Samen bilden, die die Brauqualität und die Schaumstabilität des Bieres mindern.

Der europäische Kulturhopfen ist diploid mit $2n = 18$ Autosomen plus zwei Geschlechtschromosomen. Weibliche Pflanzen besitzen zwei X-Chromosomen, männliche Pflanzen ein X- und ein Y-Chromosom (Abb. 1).

Vater Mutter	X_1	Y
X_1	X_1X_1	X_1Y
X_2	X_2X_1	X_2Y

Abbildung 1: Theoretisch zu erwartende Geschlechtschromosomenkonstellation der Gameten bei Hopfen.

Das Y-Chromosom ist kleiner als das X-Chromosom (Winge, 1929; Parker und Clark, 1991; Shepard et al., 2000). Karlov et al. (2003) wiesen anhand von Signalen aus der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung und DAPI-Mustern nach, dass das Y-Chromosom das kleinste aller Chromosomen ist, während es sich bei dem X-Chromosom um ein Chromosom mittlerer Größe handelt. Ähnlich wie bei *Rumex* erfolgt die Geschlechtsausprägung nach dem klassischen Drosophila-System (Parker und Clark, 1991). Das Verhältnis der X-Chromosomen zum Autosomensatz ist geschlechtsbestimmend (Neve, 1991). Es wird angenommen, dass das Y-Chromosom des Hopfens für die Pollenfertilität des männlichen Hopfens verantwortlich ist (Neve, 1991). Zwitterpflanzen weisen ein Verhältnis von X-Chromosomen zum Autosomensatz zwischen 0,5 und 1 auf. Neben dem diploiden Hopfen wurde bereits sehr früh mit der Züchtung eines polyploiden Hopfens begonnen. Durch eine Behandlung mit Colchizin wurde 1966 ein tetraploider ($2n=4x=40$) Hopfen erzeugt (Haunold et al., 1971). In folgenden Züchtungsprogrammen wurden aus tetraploiden x diploiden Hopfen triploide ($2n=3x=30$) Hopfenpflanzen generiert, die durch ein schnelleres Wachstum, kräftigere Pflanzen, ein hohes Ertragsniveau und Sterilität gegenüber den diploiden Pflanzen überzeugten (Haunold, 1991; Koutoulis et al., 2005). Vor allem in Australien liegt der aktuelle Schwerpunkt in den Züchtungsprogrammen auf der Induzierung tetraploider Hopfen zur späteren Erzeugung von triploiden Hopfen (Koutoulis et al., 2005). Das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Pflanzen innerhalb der triploiden Hopfen bewegte sich bei Haunold (1991) genauso wie bei Neve (1991) bei ca. 70 % weiblichen zu ca. 3 % männlichen Pflanzen. Ca. 20 % der aus diesen Kreuzungen entstandenen Pflanzen waren monözisch. Haunold (1991) vermutete, dass diese Pflanzen zwei X- und ein Y-Chromosom tragen. Die Größe des weiblichen Genoms von *Humulus lupulus* var. *lupulus* wurde erstmals bei Grabowska-Joachimciak et al. (2006) im diploiden Stadium auf 5,598 pg ermittelt. Dies entspricht in Megabasenpaaren (Mbp) einer

Größe von 5402,07 Mbp. Das männliche Genom war etwas kleiner mit 5,523 pg, was wahrscheinlich auf das kleinere Y-Chromosom im Verhältnis zum X-Chromosom zurückzuführen ist (Grabowska-Joachimiak et al., 2006).

1.3 Biologie und Bedeutung des Echten Mehltaus bei Hopfen

Podosphaera macularis ssp. *humuli* Braun (früher *Sphaerotheca humuli* Burr.) gehört in der Systematik der Pilze zu den Ascomyceten. Innerhalb dieser Gruppe werden die Mehltaupilze in der Ordnung Erysiphales zusammengefasst und gehören zur Familie der *Erysiphaceae*, der Familie der Echten Mehltaupilze. *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* ist ein obligater Parasit, der ausschließlich auf Hopfen (sowohl Kultur- als auch Wildform) vorkommt (Royle, 1978) und Blätter, Blüten und Dolden befällt.

Die Primärinfektion findet durch das Freisetzen der Ascosporen (sexuelle Form) aus den Kleistothecien statt, die mit dem Wind auf die jungen Triebe und Blätter gelangen. Mit Hilfe von Appressorien heften sie sich an den Wirt. Etwa vier Tage nach Infektionsbeginn werden von den somatischen Pilzhyphen Konidienträger gebildet (Konidiophoren), in denen die kettenförmig angeordneten Konidien (asexuell) erzeugt werden und über den Wind weiter verbreitet werden (Abb. 2).

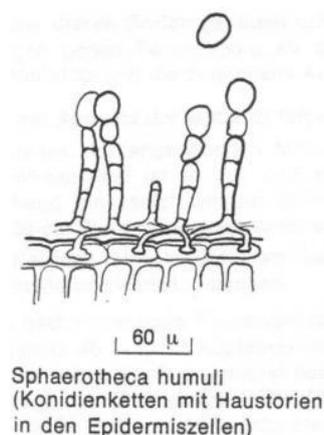


Abbildung 2: *Podosphaera macularis* ssp. *humuli*. Konidienketten mit Haustorien in den Epidermiszellen (Neve, 1991).

Die Sekundärinfektion wird durch den Befall der Blätter und Blüten bzw. Dolden durch die Konidiosporen hervorgerufen. Im Herbst beginnt die sexuelle Vermehrung des Pilzes. Aus einigen Hyphen bilden sich dazu männliche (Antheridium) und aus anderen weibliche

(Ascogon) einkernige Gametangien aus, die sich aneinander lagern. Nach der Bildung einer Ascusmutterzelle (Dicaryon), verschmelzen die beiden Zellkerne zum Zygotenkern. Das Ascogon wird von Hüllhyphen umspinnen und es entstehen sogenannte Kleistothecien. In den Kleistothecien reift ein Ascus, in dem nach der Meiose acht haploide Ascosporen entstehen. Im Herbst fallen die Kleistothecien mit den Pflanzenteilen zu Boden und überwintern dort.

Für die Sporenbildung ist eine trockene Witterung mit Temperaturen von 20 – 25 °C und diffuse Belichtung optimal, aber auch Feuchtigkeit in Form von Tau ist für die Sporenkeimung förderlich (Wiedemann, 1991).

Der erste Befall kann bereits Mitte Mai auftreten und zeigt sich in Form einzelner, pustelförmiger Erhebungen, die nach wenigen Tagen von einem weißen Myzelrasen bedeckt sind. Es können Blätter sowie alle anderen oberirdischen Pflanzenteile befallen werden (Abb. 3 und 4). Der Pilz entzieht durch seine Haustorien den Zellen lebenswichtige Substanzen und verringert die Assimilationsfläche des Blattes, wodurch die Photosynthese erheblich eingeschränkt wird (Wiedemann, 1991). Der Blattbefall erhöht die Inokulationsmenge und somit wächst die Gefahr für eine Blüten- und Doldeninfektion stark an. Die Dolden sind in jedem Stadium bis zur Ernte anfällig. Werden die Dolden zu Beginn der Ausdoldung befallen, wachsen sie nicht mehr weiter oder zeigen Missbildungen. Im weiteren Verlauf verfärben sie sich braun bis schwarz. Sie verlieren ihr gutes Aroma und bekommen einen unangenehmen, modrigen Geruch, was zu einer gravierenden Qualitätsminderung des Hopfens führt. Die Infektionen mit Echtem Mehltau reduzieren zudem den Gehalt an α -Säuren um 12 bis 25 % wie auch den Gehalt an β -Säuren, was ebenso zu einer Qualitätsminderung des Hopfens führt (Krofta und Nesvadba, 2003). Insgesamt kommt es durch die Infektion sowohl zu einem qualitativen als auch einem quantitativen Ertragsverlust. Die jährliche Bekämpfung kostet allein in dem Gebiet der Hallertau jährlich etwa 4,9 Mio. Euro (Münsterer, persönliche Mitteilung).

Meist bleibt das Populationsniveau des Erregers bis Mitte Juli niedrig und steigt dann bis Mitte August stark an. Der Grund liegt darin, dass Infektionen der Blätter sehr viel wirksamer mit Pflanzenschutzmitteln bekämpft werden können, während Mehltau an Blüten und später an und in den Dolden deutlich schwieriger bzw. gar nicht mehr über Fungizide kontrolliert werden kann. Somit ist diese Zeit für die Hopfenanbauer besonders kritisch, da kurz vor der Ernte keine Pflanzenschutzmittelmaßnahmen mehr durchgeführt werden dürfen.



Abbildung 3: *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* an Hopfenblättern.



Abbildung 4: *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* an Hopfendolden.

Die Inkubationszeit von Beginn der Infektion bis zum Ausbruch der Krankheit beträgt ca. 10 bis 14 Tage.

Der Echte Mehltau stellt gegenwärtig eine der wirtschaftlich bedeutendsten Pilzkrankheit des Hopfens dar. Die Pilzkrankheit ist in fast allen Hopfenanbaugebieten der Welt (Europa, USA, Asien) verbreitet. Der Echte Mehltau verursachte bereits vor 300 Jahren große Probleme im englischen Hopfenanbau (Royle, 1978). In dem Gebiet der Hallertau in Deutschland führte der Echte Mehltau erstmals 1972 zu einer größeren Krankheitsepidemie (Wiedemann, 1991). 1997 trat ein starker Mehлтаubefall in den USA auf, der in dem Gebiet des Yakima Valley zu dramatischen Ertragsausfällen führte (Gent et al., 2008). Auch heute noch stellt der Echte Mehltau sowohl in Deutschland als auch in den USA (Gent et al., 2008) ein erhebliches Problem in der Hopfenproduktion dar.

1.4 Resistenz und Resistenzzüchtung beim Hopfen gegenüber dem Echten Mehltau

Bereits 1907 berichtete der englische Forscher Salmon von einer Resistenz des Hopfens gegenüber dem Echten Mehltau des Hopfens (Neve, 1991). Die ersten umfassenden Studien über die Mehлтаuresistenz bei Hopfen und über die Pathogen/Wirt-Interaktionen stammen aus

England (Darby und Gunn, 1987; Darby et al., 1989; Neve, 1991). Bei der Mehlttauresistenz beim Hopfen handelt es sich um eine rassenspezifische und qualitativ vererbte Resistenz. Bisher wurden acht Resistenzgene beschrieben (Darby, 1998b; Seefelder et al., 2006), wobei alle Resistenzgene dominant vererbt werden (Darby und Gunn, 1987; Darby et al., 1989; Neve, 1991). Diese Resistenzgene ermöglichen es Pflanzen, bestimmte Rassen eines Phytopathogens zu erkennen und eine effektive Abwehrreaktion anzuschalten. Als Voraussetzung gilt dabei, dass das Pathogen ein korrespondierendes Avirulenzgen trägt (Gen-für-Gen-Modell; Flor, 1971) (Abb. 5).

Abbildung 5: Wechselwirkungen zwischen einer diploiden Pflanze und einem haploiden Pathogen. R_1 =Resistenzgen (homo- oder heterozygot), A_1 = Avirulenzgen. Besitzt das Pathogen das korrespondierende Avirulenzgen zum Resistenzgen R_1 , dann wirkt das Resistenzgen und es kommt nicht zum Befall. + = Befall (krank), -- = kein Befall (gesund); verändert nach Miedaner (2010).

Genotyp Pflanze \ Genotyp Pathogen	$R_1 R_1$	$R_1 r_1$	$r_1 r_1$
A_1	--	--	+
a_1	+	+	+

Entsprechend der Gen-für-Gen-Hypothese wurden in England die bekannten Resistenzgene mit ihren entsprechenden Avirulenzgenen (Avr-Gen) charakterisiert (Neve, 1991; Darby, persönliche Mitteilung) (siehe Tab. 1). Fehlt eines der beiden Gene bzw. Genprodukte kommt es zur Besiedelung der Pflanze.

Tabelle 1: Übersicht der bisher bekannten dominanten Mehltaresistenzgene und ihre Virulenzgene beim Hopfen (Quelle: Neve, 1991; P. Darby, persönliche Mitteilung).

Sorte	Herkunft	Resistenzgen	Avirulenzgen
Wye Challenger, Yeoman,	England	R_b	v_b
Zenith, Buket	England	R_1, R_b	v_1, v_b
Wye Target	England	R_2	v_2
Wye Challenger	England	R_3, R_b	v_3, v_b
Serebrianka	Russland	R_4	v_4
Early Choice	England	R_5	v_5
Nugget	USA	R_6	v_6
Newzealand	Neuseeland	R_7	v_7

Weder die Funktion noch Enzyme, die für diese Resistenzgene kodieren, konnten bisher bestimmt oder kloniert werden (Henning et al., 2011). Die bisher einzige Studie über den Resistenzmechanismus der resistenten Sorte Wye Target (R_2 Resistenzgen) bzw. den Infektionsverlauf der anfälligen Sorte Northern Brewer gegenüber dem Echten Mehltau, wurde von Godwin et al. (1987) durchgeführt. In der Ausprägung der Konidienkeimung oder der Haustorienbildung konnten keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden. Die Abwehrreaktion machte sich aber bemerkbar durch eine gehemmte Ausbildung der Keimschläuche, eine verstärkte Lignifizierung und Bildung von Kallose in den befallenen Wirtsepidermiszellen, die letztlich zum Absterben der Zelle führt (hypersensitive Reaktion). Durch die Verstärkung der Zellwände werden von der Pflanze Barrieren errichtet, die ein

weiteres Vordringen bzw. Ausbreiten des Pilzes verhindern und ihm seine Nahrungsquelle entziehen. Es wurden zwar Haustorien auf den resistenten Pflanzen gebildet, diese entwickelten sich aber nicht weiter und starben schließlich ab. Godwin et al. (1987) schließen eine Beteiligung von Fungitoxinen an der Resistenzreaktion von Wye Target nicht aus. Der Resistenzmechanismus gegenüber *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* ist trotz einiger Unterschiede vergleichbar mit dem Pathosystem Echter Mehltau bei Getreide und Arabidopsis (Hückelhoven, 2005). Liyange (1973) und Darby (1998a) stellten eine Verbindung zwischen der Produktion von Selenen in den ätherischen Ölen und der von dem R_b -Gen vermittelten Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau her. Aufbauend auf dieser Vermutung identifizierten Cerenak et al. (2009) sieben Resistenzmarker, die eine positive oder negative Korrelation zwischen der Mehлтаubonitur und Anwesenheit in den ätherischen Ölen von extrem anfälligen oder resistenten Sorten aufwiesen. Der Aromastoff Alpha-Selenin wurde als ein Resistenzmarker identifiziert. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass Selenin möglicherweise bei der Resistenzreaktion gegenüber dem Echten Mehltau bei Hopfen beteiligt ist.

An der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft am Hopfenforschungszentrum in Hüll wird seit 1995 daran gearbeitet, die Widerstandsfähigkeit des Hopfens gegenüber dem Echten Mehltau im Hüller Zuchtmaterial und in den neuen Sorten deutlich zu verbessern. Sowohl bei den Hochalphasorten (Bittersorten) als auch bei den Aromasorten gibt es derzeit keine Sorten, die eine sehr gute Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau vermitteln (Tab. 2). Lediglich die Aromasorten Hallertauer Mittelfrüh und Saphir zeigen eine gute Resistenz. Umfangreiche Studien zum Virulenzspektrum von Mehлтаupopulationen aus Deutschland, England, Frankreich und den USA hatten gezeigt, dass alle bisher bekannten Resistenzgene beim Hopfen von virulenten Mehltastämmen durchbrochen worden sind. Aus diesem Grund war es nötig, neue Resistenzquellen aus Wildhopfen für die Züchtung zu finden. Seit 2001 wurden über 25.000 Wildhopfen aus Europa, Asien, Australien und Nordamerika im Gewächshaus und im Labor auf ihre Resistenzreaktion gegenüber dem Echten Mehltau getestet (Seignier et al., 2006). Resistente Wildhopfen wurden als Kreuzungspartner in den Züchtungsprogrammen eingesetzt, um die genetische Basis für die Resistenz gegenüber *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* im Hüller Zuchtmaterial zu verbreitern und um neue Sorten mit neuen Resistenzmechanismen zu entwickeln. Die Züchtung erfolgt mit Hilfe der klassischen Kreuzungszüchtung und wird seit einigen Jahren durch die Genomanalyse unterstützt. So wurden bereits Selektionsmarker für die von Wye Target (R_2) (Seefelder et al., 1997; Seefelder

et al., 2005) und für die von Buket (R_b) (Seefelder et al., 2006) vermittelte Mehltairesistenz entwickelt.

Tabelle 2: Übersicht zu wichtigen Hopfensorten und deren Resistenz/Toleranz gegenüber dem Echten Mehltau.

Resistenz gegenüber Echem Mehltau	
Bittersorten	
Nugget	--
Hallertauer Magnum	---
Hallertauer Taurus	--
Hallertauer Merkur	++ (+)
Herkules	(regional begrenzte Resistenzwirkung)
Aromasorten	
Hallertauer Mittelfrüh	+
Hallertauer Tradition	+/-
Spalter Select	-
Perle	-
Saphir	+
Smaragd	-
Opal	+/-

Schlüssel: +++ sehr gute Resistenz, ++ gute bis sehr gute Resistenz, + gute Resistenz; --- sehr geringe Resistenz, --geringe bis sehr geringe Resistenz, - geringe Resistenz.

1.5 Molekulare Marker

Der Einsatz von molekularen Markern gewinnt bei der Züchtung zunehmend an Bedeutung. Grundlage aller molekularen Markersysteme sind Sequenzunterschiede in der DNA verschiedener Genotypen. Molekulare Marker sind in allen Geweben und Entwicklungsstadien nachweisbar, zeigen keine epistatischen Wechselwirkungen oder Wechselwirkungen mit der

Umwelt und sind in theoretisch unbegrenzter Anzahl vorhanden. Ein weiterer Vorteil der Selektion auf DNA-Ebene beruht auf der Tatsache, dass geringe Mengen an Blattmaterial ausreichen, um die für die Analysen benötigte DNA zu extrahieren. Molekulare Marker, die eng an Bereiche gekoppelt sind, die z. B. an der Ausprägung der Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau beteiligt sind, ermöglichen in markergestützten Züchtungsprogrammen eine einfache, schnelle und sichere Selektion gesunder Genotypen. Dabei erhöhen sie die Effektivität von Züchtungsprogrammen, da eine Selektion bereits in einem frühen Entwicklungsstadium, zum Beispiel am Keimling, erfolgen kann. Mit molekularen Markern ist es ebenso möglich, sehr früh auf ein im Lebenszyklus der Pflanze erst später feststellbares Merkmal, z. B. auf das Geschlecht beim Hopfen, zu selektieren. Die ersten molekularen Marker, die das männliche Geschlecht des Hopfens charakterisierten, wurden auf Basis von RAPD-Markern entwickelt (Polley et al., 1997). Mit Hilfe von molekularen Markern lässt sich eine erfolgreiche Pyramidisierung verschiedener Resistenzgene einfach nachweisen. Sie erleichtert die Introgression von Resistenzgenen aus Wildmaterial. Mit codominanten Markersystemen können auch homo- und heterozygote Genotypen unterschieden werden.

Ein Schritt zur Identifizierung relevanter Genomregionen für das betreffende Zielmerkmal ist die Erstellung von genetischen Karten mit molekularen Markern. Als erster Schritt wird zunächst eine spaltende Kartierungspopulation erstellt. Anschließend wird die Kartierungspopulation mittels molekularer Marker genotypisiert, um Rekombinationshäufigkeiten festzustellen, welche als Grundlage für die Berechnung des genetischen Abstandes zwischen den einzelnen Markern dienen. Der genetische Abstand wird in centi Morgan (cM) angegeben. Mit Hilfe von Computerprogrammen wie beispielsweise JoinMap® (van Ooijen und Voorrips, 2001) oder Mapmaker (Lander et al., 1987) werden die genetischen Karten berechnet. Die Wahrscheinlichkeit einer freien Spaltung bzw. einer Kopplung wird von diesen Programmen gegen einen festen Schwellenwert (Logarithm of Odds; LOD) getestet. Mit Hilfe der Haldane- (1919) oder Kosambi- (1944) Funktion werden die Rekombinationsfrequenzen in cM umgerechnet. Die erste Chromosomenkarte von Hopfen wurde auf Basis von AFLP- mit zusätzlichen RAPD- und STS-Markern erstellt (Seefelder et al., 2000). Die weibliche und männliche Karte deckten 346,7 cM bzw. 227,4 cM des Hopfengenoms ab. An einer Vergrößerung der für Hopfen verfügbaren genetischen Karten wird seither gearbeitet (Cerenak et al., 2006; Jakse et al., 2010; Patzak, 2011).

1.5.1 AFLP-Marker

Die AFLP-Methode ist eine PCR-Technik, die erstmals von Vos et al. (1995) beschrieben wurden. Mit der AFLP-Technik wurde eine äußerst effiziente und robuste Methode geschaffen, die mit einer geringen DNA-Menge, ohne notwendige Sequenzinformation und mit einer hohen Reproduzierbarkeit ein hohes Maß an Polymorphismen produziert (Zabeau und Vos, 1993). Im ersten Schritt wird die genomische DNA mit einer häufig und einer selten schneidenden Restriktionsendonuklease verdaut. Anschließend werden Adaptoren an die jeweils komplementären Schnittstellen der unterschiedlich großen DNA-Fragmente ligiert, die nachfolgend als Primerbindungsstellen fungieren. Da die Pflanzen ein komplexes Genom aufweisen, ist eine Reduktion der zu vermehrenden Fragmente notwendig, um spezifische Bandenmuster zu erhalten. Dies erfolgt mit Hilfe einer zweistufigen PCR-Reaktion. In der Präamplifikation werden Primer eingesetzt, die zum einen komplementär zur jeweiligen Adapter- und Schnittstellensequenz sind und am 3'-Ende eine zusätzliche Base zur Erhöhung der Selektivität tragen. In der selektiven Amplifikation werden Primer verwendet, die zusätzlich zwei bis drei selektive Nukleotide am 3'-Ende aufweisen. Je größer die Zahl der Nukleotide ist, desto selektiver ist die Amplifikation. Die Polymorphie der AFLP-Marker entsteht auf Grund von Unterschieden in den Restriktionsschnittstellen auf genomischer Ebene. AFLP-Marker werden meist dominant ausgewertet. Aus AFLP-Fragmenten, die eine Assoziation zu interessierenden Zuchtmerkmalen zeigen, können nach Klonierung und Sequenzierung allelspezifische diagnostische Marker abgeleitet werden (Brugmans et al., 2003).

Während die ursprünglich von Vos et al. (1995) beschriebene Methode auf den beiden Restriktionsenzymen *EcoRI* und *MseI* beruht, sind mittlerweile weitere Enzymkombinationen beschrieben und etabliert worden. Am häufigsten werden die Enzyme *EcoRI*, *PstI*, *HindIII* und *ApaI* kombiniert mit *MseI* oder *TaqI* (Savelkoul et al., 1999).

1.5.2 Mikrosatelliten

Mikrosatelliten bzw. SSR (Simple Sequences Repeats)-Marker sind charakterisiert durch kurze, wiederholte Sequenzmotive (zwei bis sechs Basenpaare), die häufig im Genom vorkommen und gleichmäßig über das Genom verteilt sind (Wang et al., 1994). Polymorphe Mikrosatelliten-Marker entstehen durch die unterschiedliche Anzahl an Wiederholungen. Mikrosatelliten besitzen auf Grund ihrer Struktur einen hohen Polymorphiegrad, sind multi-allelisch und werden codominant ausgewertet. Oftmals sind Mikrosatelliten auch

lokusspezifisch, wodurch eine Zuordnung von Kopplungsgruppen zu spezifischen Chromosomen möglich ist. Spezielle Mikrosatelliten für den Hopfen wurden u.a. von Hadonou et al. (2004), Stajner et al. (2005) und Jakse et al. (2008a und 2010) entwickelt.

1.6 Expressionsanalysen

Um den Genexpressionsstatus und damit die Genaktivität eines Organismus unter definierten Bedingungen zu studieren, wurden in den letzten Jahren verschiedene Verfahren zur Transkriptomanalyse entwickelt. Zu nennen sind dabei die cDNA-Analysen (Bachem et al., 1996), Macroarrays (Desprez et al., 1998), Microarrays (Schena et al., 1995) oder die SAGE-Methode (serial analysis of gene expression; Velculescu et al., 1995) und in jüngster Zeit auch die Sequenzierung von ganzen Transcriptomen über die sog. „Next Generation Sequencing“ (Bellin et al., 2009), die allerdings sehr teuer ist.

In dieser Arbeit wurden Genexpressionsanalysen mit Hilfe der cDNA-AFLP-Technik durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine sehr erfolgreich eingesetzte und weit verbreitete Methode, die bei vorhandener Grundausstattung relativ einfach und kostengünstig durchzuführen ist. Nur geringe Mengen an RNA sind nötig, um mit dieser gelbasierten Methode exprimierte Transkripte zu identifizieren und visualisieren, welche unter definierten Bedingungen erzeugt wurden. Alle zu einem bestimmten Zeitpunkt aktivierten Gene, auch selten exprimierte oder noch unbekannte Gene, können dargestellt werden. Ein großer Vorteil gegenüber den auf Hybridisierung basierenden Microarrays beruht auf der Tatsache, dass keinerlei Sequenzinformationen vor der Analyse nötig sind (Breyne et al., 2003) sowie die Unabhängigkeit von EST-Datenbanken und cDNA-Bibliotheken. Interessante und differentiell exprimierte Fragmente müssen anschließend aus dem Gel eluiert und sequenziert werden, um Informationen zur möglichen Funktion zu erlangen. Interessante Transkripte können wie bei genomischen AFLPs in genomische, allelspezifische Marker umgewandelt werden (Korell et al., 2008).

1.7 Ziel dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten zum einen DNA-Marker für neue Mehlttauresistenzgene in verschiedenen Kreuzungen identifiziert und in einer Kopplungskarte kartiert werden. Zu diesem Zweck wurden mehlttauresistente Wildhopfen in das Hüller Zuchtmaterial eingekreuzt. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Resistenz des Wildhopfens WH18. Die Resistenz dieses

Wildhophens widerstand bei Beginn der Arbeiten im Jahr 2004 dem gesamten für Deutschland repräsentativen Mehltaurassenspektrum. Des Weiteren wurden Kreuzungen mit dem männlichen Zuchtstamm 92/076/721 hergestellt, der die Resistenz des japanischen Wildhophens JAP-C845 in sich trägt. Da es sich bei beiden um völlig neue Resistenzen handelte, sollten ebenso Erkenntnisse über die Vererbung der Resistenzgene gewonnen werden. Durch die Pyramidisierung der auf dem neuen Resistenzgen basierende Resistenz des Wildhophens WH18 mit der noch wirksamen Resistenz der englischen Sorte Wye Target und der Resistenz des japanischen Wildhophens JAP-C845 sollte ein langfristiger Schutz gegenüber dem Echten Mehltaupilz erreicht werden. Mit den für die verschiedenen Resistenzgene identifizierten molekularen Markern sollte der Nachweis der erfolgreichen Kombination aller drei Resistenzen geführt werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollten über Expressionsanalysen genspezifische cDNA-AFLP-Marker, die mit der Widerstandsfähigkeit gegenüber Echtem Mehltau assoziiert sind, entwickelt werden. Mit dieser Technik besteht die Chance, Marker zu entwickeln, die direkt im Bereich des für die Resistenzausprägung verantwortlichen Gens liegen. Des Weiteren sollten mittels einer Datenbankrecherche Homologien zu bereits bekannten ESTs identifiziert werden, deren Funktion aufgeklärt ist und im Zusammenhang mit Resistenz- bzw. Abwehrreaktionen stehen, um Rückschlüsse auf Gene ziehen zu können, die möglicherweise an der Ausprägung der Resistenz beteiligt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial – Wildhopfen als neue genetische Ressource für die Mehлтаuresistenzzüchtung

Seit 2001 wurden am Hopfenforschungsinstitut in Hüll mehr als 25.000 Wildhopfen mit verschiedensten Herkünften aus Europa, Asien, Australien und Nordamerika im Gewächshaus auf ihre Reaktion gegenüber verschiedenen Mehлтаuisolaten getestet. Hierbei wurden virulente Mehлтаustämme ($v3$ -, $v4$ -, $v6$ -, vB -Virulenz Typen), die alle in der Hallertauer Region bereits vorkamen, verwendet. Für diejenigen Wildhopfen, die als resistent eingestuft wurden, folgte danach im Labor ein weiteres Resistenzscreening unter Verwendung des „Blatt-Resistenzprüfsystems in der Petrischale“ (detached leaf assay). Diese Methode wurde in Zusammenarbeit mit der Firma EpiLogic entwickelt (Seigner et al., 2002.). Im Labor bei EpiLogic konnten ohne Gefahren für das Hopfenanbaugebiet auch virulente Pilzstämme mit der $v1$ -, $v2$ - und $v5$ - Virulenz aus England zur Resistenztestung eingesetzt werden, die bisher nicht in Deutschland auftreten. Nachfolgend wurde auch die Resistenzeinschätzung auf dem Feld unter natürlichen Infektionsbedingungen getestet. Obgleich wegen des geringen Infektionsdrucks in den Jahren von 2003 bis 2005 diese Freilandbonituren nur sehr begrenzte Aussagekraft hatten, konnten über den in der Praxis etablierten „Blattresistenz-Test“ doch recht zuverlässige Resistenzdaten über die Jahre hinweg gesammelt werden. So konnten letztlich nach umfassenden Prüfungen bis Mai 2006 54 Wildhopfen selektiert werden, die neue bisher noch nicht charakterisierte Resistenzgene besaßen und eine Resistenz gegenüber allen bisher bekannten virulenten Mehлтаustämmen aufwiesen (Tab. 3, Seigner et al., 2006).

Tabelle 3: Resistenzquellen für den Echten Mehltau in Wildhopfenherkünften aus aller Welt.

Ursprung Wildhopfen		Geschlecht
Deutschland	Harburg	männlich
Deutschland	Brunning	weiblich
Deutschland	Staudach	weiblich
Deutschland	Schweinfurt	weiblich
Deutschland	Kleinmachnow	männlich
Deutschland	Pirna	männlich und weiblich
Deutschland	Peninsula Zingst	männlich
Deutschland	Berlin	weiblich
Deutschland	Eifel (WH18)	männlich und weiblich
Deutschland	Neumarkt	?
Türkei	Bursa	weiblich und männlich
China/Japan	Unbekannt	weiblich und männlich
Jap C845	Japan	weiblich
Schweden	Julita	weiblich
Neuseeland	unbekannt	weiblich
USA	Missouri	?
USA	Nebraska	?

2.2 Kartierungspopulationen zur Identifizierung von Mehltauresistenzmarkern

Im Rahmen dieses Projektes wurden aus den 54 als resistent eingestuften Wildhopfen mehrere vielversprechende, bis zum damaligen Zeitpunkt voll resistente Wildhopfen ausgewählt, um die genetische Basis für Mehlttauresistenz im Hüller Zuchtmaterial zu erweitern und um neue Resistenzmechanismen in künftigen Hüller Sorten nutzen zu können (Abb. 6). Zum einen wurden zwei männliche (W18/97/003 und W18/97/007) und zwei weibliche Sämlinge (WH18/97/006 und WH18/97/008) des Wildhopfens WH18 aus der Eifel als vollständig mehlttauresistente Hopfen ausgewählt, und darüber hinaus der Sämling 92/076/721, der von einem japanischen Wildhopfen mit der Bezeichnung JAP-C845 abstammte.

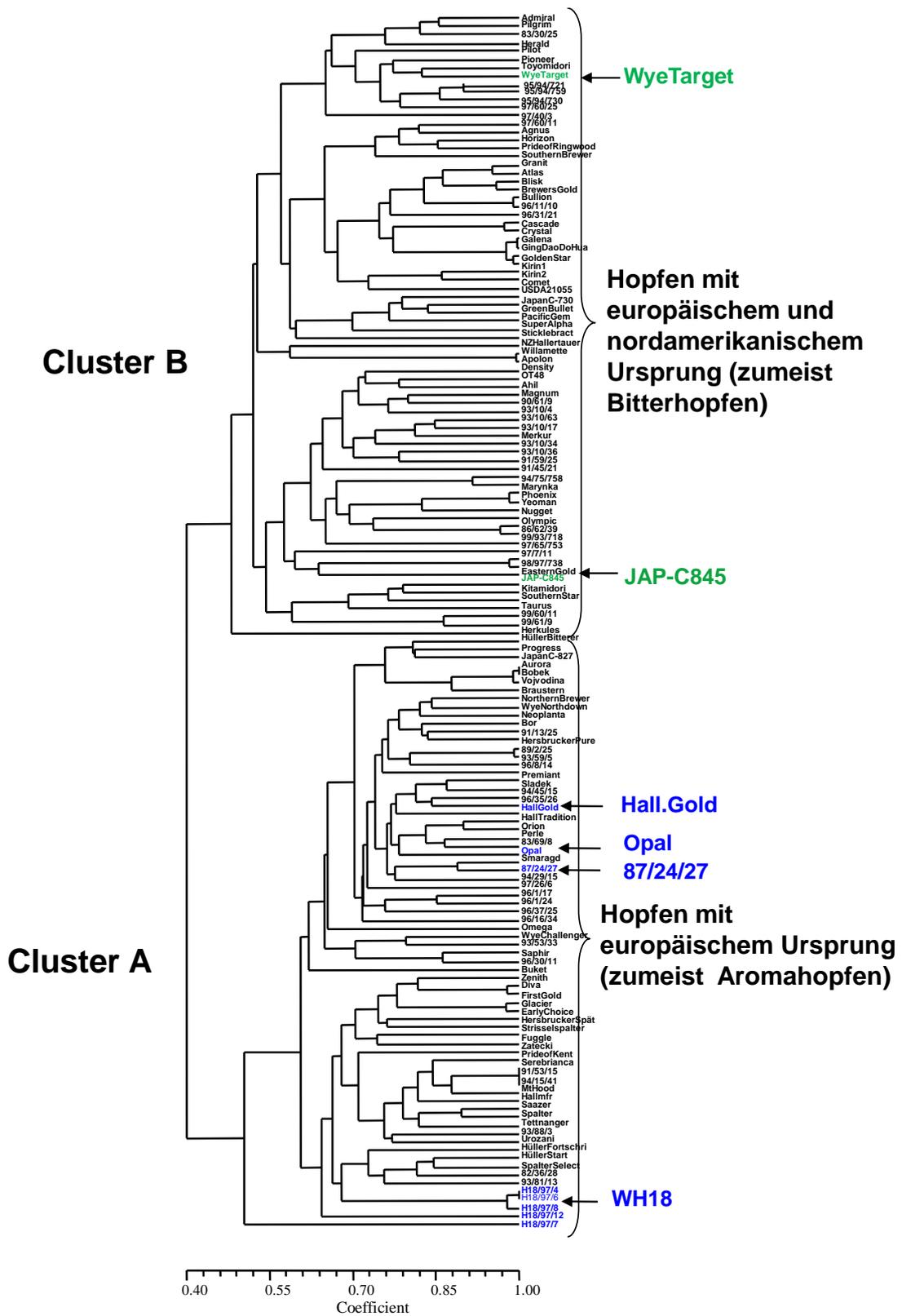


Abbildung 6: UPGMA-Cluster aus AFLP-Fingerprint-Daten des internationalen Hopfensortiments (Seefeldler unveröffentlicht). Cluster A stellt den Hopfen mit europäischem-, Cluster B mit europäischem und nordamerikanischem Ursprung dar.

Bei den Wildhopfen WH18 handelte es sich um mehltaresistente Genotypen aus Deutschland mit genauem Ursprung in Buldern in der Westfälischen Bucht (Tab. 3). Diese Wildhopfen erwiesen sich bis 2008 gegenüber allen zur Verfügung stehenden Mehltaurassen ($v1$, $v2$, $v3$, $v4$, $v5$, $v6$, $v7$, vB) als vollständig resistent, wobei es sich nach bisherigen Erkenntnissen um eine bislang unbekannte Mehltaresistenz handelte (R_{WH18}). Auch bei der Einstufung der Aromaintensität bekam dieser Wildhopfen Bestnoten (Forwick et al., 2003). Zur Identifizierung von molekularen Markern für das Resistenzgen aus diesen Wildhopfen wurden spaltende Populationen verwendet, die aus Kreuzungen zwischen einem mehltaresistenten und einem mehltauanfälligen Elter hervorgingen (Tab. 4). Dabei wurde darauf geachtet, dass einmal der weibliche Kreuzungspartner die WH18-Resistenz einbrachte und bei drei weiteren Kreuzungen, die WH18-Resistenz von zwei verschiedenen männlichen WH18-Nachkommen kam. Darüber hinaus wurden zwei gezielte Kreuzungen zweier resistenter Eltern erstellt, bei denen die Wirksamkeit der beiden unabhängig vererbten Resistenzgene ermittelt werden sollte (Tab. 5). Bei der einen Kreuzung handelte es sich um die Kreuzung des resistenten Wildhophfens WH18/97/008 (R_{WH18}) und dem männlichen Zuchtstamm 92/076/721, der das Resistenzgen des japanischen Wildhophfens JAP-C845 in sich trägt ($R_{JAP-C845}$). Bei einer zweiten Kreuzung zweier resistenter Eltern wurde die R_2 -Resistenz aus der englischen Sorte Wye Target mit dem auf R_{WH18} beruhenden männlichen Wildhophfen WH18/97/003 kombiniert. Alle Kreuzungen wurden an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft am Hopfenforschungszentrum in Hüll durchgeführt.

Tabelle 4: Kartierungspopulationen aus der Kreuzung eines mehltaresistenten mit einem mehltauanfälligen Elter. Die jeweiligen Resistenzen stehen in Klammern hinter den Eltern.

Elter (weiblich)	x	Elter (männlich)
WH18/97/006 (R_{WH18})	x	87/024/027
Hallertauer Gold	x	WH18/97/003 (R_{WH18})
87/024/056	x	WH18/97/007 (R_{WH18})
Opal	x	WH18/97/003 (R_{WH18})

Tabelle 5: Kartierungspopulationen aus der Kreuzung mit zwei mehltaresistenten Eltern.

Elter (weiblich)	x	Elter (männlich)
WH18/97/008 (R_{WH18})	x	92/076/721 ($R_{JAP-C845}$)
Wye Target (R_2)	x	WH18/97/003 (R_{WH18})

Bis auf die Kreuzung Wye Target x WH18/97/003, die 2005 gemacht wurde, wurden alle anderen Kreuzungen im Jahr 2003 durchgeführt. Die Samen der jeweiligen Kreuzungen wurden im November in Schalen ausgesät und zur Kältebehandlung, die für eine effektive Keimung nötig ist, bis Anfang Februar bei Freilandtemperaturen aufbewahrt. Nachdem die Schalen ins Gewächshaus zurückgebracht worden waren, begannen die Samen zu keimen. Die Sämlinge wurden pikiert und mit einer laufenden Nummer versehen. Zur Evaluierung der Mehltreuerresistenzen wurden je Kartierungspopulationen 140 Individuen untersucht. Nach Ausfall einiger Individuen standen bei der Kreuzung WH18/97/006 x 87/024/027 nur 136 und bei der Kreuzung WH18/97/008 x 92/076/721 nur 131 Pflanzen zur Verfügung.

2.3 *In vitro*-Vermehrung

Um genügend Ausgangsmaterial für die cDNA-Analyse zur Verfügung zu haben, wurden jeweils drei beim Blatt-Test im Labor als resistent und drei als anfällig eingestufte Hopfenpflanzen der Population Opal x WH18/97/003 *in vitro* kultiviert.

Das Nährmedium wurde nach vorliegendem Rezept, siehe Tab. 6, hergestellt. Es wurde ein MS (Murashige und Skoog, 1962) Medium mit BAP als Phytohormon verwendet.

Tabelle 6: MS-BAP-Medium für 1 Liter.

Reagenz	Endkonzentration	Menge
Agar	0,7 %	7 g
Glucose	2 %	20 g
MS-Medium mit Vitaminen	-	4405,19 mg
BAP	1 mg/L	1 ml
Proclin	3 ppm	200 µl
Milli-Q-Wasser	-	1000 ml

Nach der Herstellung des Agar-Gemisches mit 500 ml Milli-Q-Wasser, wurde dieses im Autoklav (Tuttnauer 2450EL) bei 121 °C sterilisiert. Parallel wurden Glucose, MS-Medium mit Vitaminen von Duchefa und BAP (1 mg/l) mit 500 ml Milli-Q-Wasser gemischt und der pH auf 5,8 eingestellt. Das Nährstoff-Phytohormon-Gemisch und Proclin wurden über

Sterilfiltration unter der Reinraum-Werkbank der Agarlösung zugegeben. Ca. 40 ml des noch warmen Nährmediums (MS-BAP) wurden jeweils in eine Polystyrol-Dose abgefüllt.

Ausgangsmaterial für die *in vitro*-Kultivierung der ausgewählten Individuen aus der Kartierungspopulation waren die im Gewächshaus in Hüll angezogenen Pflanzen. Dafür wurden 5-10 cm lange Sprosse mit einer Schere abgeschnitten und nachfolgend im Labor mit einem Skalpell vor und nach jedem Nodium in einzelne Nodalsegmente mit ca. 1 cm Länge zerteilt und die Blätter entfernt. Anschließend wurden die Nodienabschnitte, die sich in einem Teesieb befanden, für 5 min. in eine 4%igen Na-Hypochloridlösung mit Zusatz von 2-3 Tropfen Tween getaucht und danach dreimal für 10-15 min. mit sterilem Milli-Q-Wasser gespült. Die oberflächensterilisierten Nodalsegmente wurden anschließend mit einer Pinzette in das MS-BAP Medium gesetzt und im Klimaschrank bei 22-25 °C und einer 16 Stunden Licht- und 8 Stunden Dunkelphase kultiviert. Nach 8-10 Wochen konnten aus den herangewachsenen Sprossen wieder über Nodienabschnitte weiter kloniert werden.

2.4 Inokulation

2.4.1 Mehltauinokulation der Kartierungspopulation

In Zusammenarbeit mit der Firma EpiLogic war bereits ein standardisiertes „Blatt-Resistenzprüfsystem in der Petrischale“ (detached leaf assay) erarbeitet und etabliert worden (Seigner et al., 2002). Unter Einsatz dieses Labor-Blatt-Tests und mit einem Hopfen-Differenzialsortiment, das alle bekannten Resistenzgene umfasste, war das Virulenzspektrum von über 89 Mehltauisolaten (Einzelsporisolate von EpiLogic hergestellt) aus Deutschland, England, Frankreich und den USA, bestimmt worden. Nachfolgend stand ein Sortiment von 11 verschiedenen Einzelsporisolaten von *Podosphaera macularis* spp. *humuli* als Inokulationsmaterial mit charakterisierten Virulenzeigenschaften zur Verfügung (v1-v6, vB) mit dem die Wirksamkeit aller bislang in der Hopfenzüchtung genutzten und bekannten Resistenzgene getestet werden konnte (Tab. 7).

Tabelle 7: Virulenzreaktion von ausgesuchten Hopfenmehltauisolaten gegenüber dem Differentialsortiment bestehend aus elf Sorten und einem Wildhopfen mit den Resistenzgenen R_1 - R_6 , R_B und R_{WH18} : Northern Brewer (NB), Zenith (ZN), Wye Target (WT), Wye Challenger (WC), Serebrianker (SB), Early Choice (EC), Nugget (NU), Yeoman (YM), Buket (BU) 2006, Herkules (HS), Merkur (MR), Wildhopfen Eifel (WH18) und 92/76/721. Jahr: in diesem Jahr wurde das Sporulat gesammelt und daraus Einzelsporisolate hergestellt. Isolat: Beschreibung des Herkunftsortes oder des Zuchtstamms, auf dem das Isolat gewachsen ist. Bezeichnung: Abkürzung für das Isolat. n.b. = nicht bestimmt. Daten aus 2007, unveröffentlicht, basierend auf Seigner et al., 2002).

Resistenzgene															R_{WH18}	$R_{JAP-C845}$
Jahr	Isolat, Herkunft	Bezeichnung	Avirulenzgene	NB	ZN	WT	WC	SB	EC	NU	YM	BU	HS	MR	WH18-Sämlinge	92/076/721
2004	England 10	E10	$v1, v2, v3, v5, vB$	100	70	40	50	0	80	0	100	50	90	70	0	100
2004	England 11	E11	$v1, v2, (v3), (v5), vB$	100	90	50	20	0	50	0	100	80	80	80	0	n.b.
1999	England 8	E8	$v1, v2, v3, vB$	100	40	0	10	0	0	0	60	30	80	0	0	n.b.
1999	Hüll Zücht. 9, Deutschland	Hu9	$v3, vB$	100	0	0	40	0	0	0	90	0	0	0	0	n.b.
1999	Buch 10, Deutschland	BU10	$v3, v4, v6, vB$	100	0	0	70	90	0	60	70	0	0	0	0	0
1999	Eschelbach 1, Deutschland	ES1	$v3, v4, v6, vB$	100	0	0	60	100	0	60	80	0	<10	0	0	0
1999	Nugget 1, Deutschland	HA1	$v4, v6$	100	0	0	0	70	0	90	0	0	0	0	0	n.b.
1999	Frankreich 10	F10	-	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
1999	Hofen 1, Deutschland		$v3, vB$	100	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	n.b.
2003	WH 62/1, Deutschland	HU 62	$v1, v3, vB$	100	70	0	70	0	0	0	100	70	90	0	0	100
2004	WH Ilsede, Deutschland	HU 200	$v3, v4, v6, vB$	100	0	0	40	70	0	80	100	0	0	0	0	n.b.

Die Abschätzung des Mehлтаubefalls erfolgte ausgehend von den stärksten Befallssymptomen, in der Regel von der stark mehltauanfälligen Sorte Northern Brewer (NB), mit der Boniturnote 100, was für 100%igen Befall steht. Die Blättchen der Differentialsorten und -stämme wurden dann in Relation zur Kontrolle mit der Befallsstärke 100 %, 90 %, ... 10 % und 0 % bewertet.

Der Labor-Blatt-Test der Kartierungspopulationen wurde mit dem Isolat Hüll Züchtung 9 (Hu9) durchgeführt. Mit diesem Isolat konnten alle Individuen, die keinerlei Resistenzgene aufweisen, als mehltauanfällig erkannt werden. Die Population aus der Kreuzung WH18/97/008 (R_{WH18}) x 92/076/721 ($R_{JAP-C845}$) wurde in einem zweiten Durchgang zusätzlich mit dem Isolat WH 62/1 (HU 62) beimpft, um die Resistenz von $R_{JAP-C845}$ zu brechen, die Population Wye Target (R_2) x WH18/97/003 (R_{WH18}) mit dem Isolat E10, um die R_2 -Resistenz zu brechen.

Die Isolate wurden in einer Kühltruhe bei +3 bis +5 °C und Dauerlicht aufbewahrt. Die Vermehrung der Isolate erfolgte auf der anfälligen Sorte Northern Brewer, indem alle 4 bis 6 Wochen Konidien auf frische Blätter von Northern Brewer überimpft wurden. Nach einer Woche Myzelwachstum wurden die Isolate wieder kühl gelagert. Für den Infektionstest wurden im Abstand von zehn Tagen das Isolat auf jeweils drei bis vier Blättern in einer Petrischale überimpft und für ca. zehn Tage im Klimaschrank bei 22 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schalen bei 6 °C kalt gestellt (Seigner et al., 2002). Für das Resistenzscreening der F_1 -Kartierungspopulation wurde jeweils das jüngste Blattpaar eines Triebes (oberstes Blattpaar, noch nicht vollständig entfaltet) der F_1 -Nachkommen geerntet und mit der Blattoberseite nach oben in eine mit Wasseragar gefüllte Petrischale gesteckt. Um eine möglichst homogene Verteilung der Konidien auf den jungen Blättern zu erreichen, wurden die Mehltausporen eines stark mit Mehltau bewachsenen Blattes mit Hilfe eines Inokulationsturmes von oben mit einem Luftstrom auf die am Boden ausgebreiteten Petrischalen eingeblasen. Bei optimalen Bedingungen von 22 °C bei einem 12-stündigen Licht-/Dunkelrhythmus, wurden die Petrischalen für sieben bis acht Tage im Klimaschrank inkubiert und anschließend die Mehлтаubefallsstärke bonitiert. Blätter, die keine Spuren von Mehltau aufwiesen, wurden als resistent mit der Bonitur 0 eingestuft, Blätter die vollkommen mit Mehltau überzogen waren, erhielten die Boniturnote 1 für anfällig. Die Boniturnote 0 bedeutete dabei kein Befall in Relation zur hoch mehltauanfälligen Kontrolle Northern Brewer, dessen Mehлтаubefall mit 100 % bewertet wurde. Die Boniturnote 1 erhielten Individuen, die wie die Kontrolle einen Mehлтаubefall von 100 % aufwiesen. Zur Kontrolle wurde auch ein Blattpaar der jeweiligen Eltern der Kartierungspopulation dem Resistenzscreening unterzogen.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurde jeweils ein weiteres Blattpaar im Abstand von zwei Wochen getestet und der Inokulationstest im darauf folgenden Jahr noch einmal wiederholt. Abschließend wurden die jeweiligen Spaltungsverhältnisse für die F₁-Nachkommenschaften errechnet und der erwartete Prozentanteil resistenter bzw. anfälliger Pflanzen festgelegt. Die für den Resistenzlocus *R_{WH18}* erwartete 1:1-Spaltung der Marker wurde mit einem χ^2 -Anpassungstest überprüft. Damit sollte festgestellt werden, ob es signifikante Abweichungen ($p = 5\%$) der beobachteten von den theoretisch zu erwartenden Werten gibt.

2.4.2 Mehltauinokulation im Rahmen der Expressionsanalyse

2.4.2.1 Erster Versuch: Inokulation von *in vitro*-Pflanzen der Kreuzung Opal x WH18/97/003

Um eine möglichst ungestörte Reaktion der Pflanzen auf den Echten Mehltau zu erhalten, wurde in dem ersten Inokulationsversuch mit *in vitro*-Pflanzen gearbeitet. Dabei wurden zwei als resistent (T1 und T4) und zwei als anfällig (T2 und T9) eingestufte F₁-Nachkommen der Kreuzung Opal x WH28/97/003 (*R_{WH18}*) *in vitro* etabliert und *in vitro* vermehrt. Für jeden Erntezeitpunkt wurde jeweils das jüngste, voll entwickelte Blattpaar einer *in vitro*-Pflanze für die Inokulation markiert. Damit sollte abgesichert werden, dass die später detektierten TDFs auf eine Reaktion der Pflanzen auf den Mehltaupilz und nicht auf andere physiologische Unterschiede der Pflanzen zurückzuführen sind. Mit einem Pinsel wurden die Blattpaare der *in vitro*-Pflanzen mit den Pilzsporen inokuliert. Die Zeitpunkte der Probenahme nach Inokulation mit dem Echten Mehltau wurden auf Grund von Studien von Godwin (1987) mit der englischen Sorte Wye Target ausgewählt. Aus den Ergebnissen wurde abgeleitet, dass in einem Zeitraum zwischen 4 und 48 h nach Kontakt mit dem Pilz starke Veränderungen in der Genexpression stattfinden. Die Ernte von inokulierten Blättern erfolgte jeweils nach 6, 24 und 168 Stunden. Pro Genotyp wurde als Kontrolle eine unbehandelte Probe zum Zeitpunkt null genommen. Jede Probe bestand aus einem Blattpaar pro Zeitpunkt. Die Blätter wurden sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

2.4.2.2 Zweiter Versuch: Inokulation von im Gewächshaus angezogenen Wildhopfen WH18/97/003 und WH18/97/009

Um eine größere Anzahl an Pflanzen für die Inokulationen zur Verfügung zu haben, wurden in einem zweiten Versuch zwei resistente Genotypen des Wildhopfen WH18 (WH18/97/003 und WH18/97/009) vegetativ über Wurzelfeuchser vermehrt, so dass von jedem Genotyp zehn Pflanzen für die Untersuchungen zur Verfügung standen. Anders im ersten Versuchsansatz

wurden in dem zweiten Versuch nur resistente Pflanzen für die Inokulation verwendet. Die Inokulation wurde wie in Kapitel 2.4.2.1 beschrieben durchgeführt (Abb. 7). Durch die größere Anzahl an zur Verfügung stehenden Pflanzen konnten aber im Unterschied zum ersten Versuch zwei zusätzliche Erntezeitpunkte durchgeführt werden. So erfolgte die Probenahme der inokulierten Blätter zu den Zeitpunkten 4, 8, 24, 48 und 168 h. Zudem wurden als Kontrolle zu jedem Erntezeitpunkt unbehandelte Blätter der beiden Genotypen genommen.



Abbildung 7: Inokulation der im Gewächshaus angezogenen Wildhopfen.

2.5 Molekularbiologische Arbeiten

2.5.1 Isolation von genomischer DNA

Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte etwas modifiziert mittels der CTAB-Methode nach Doyle and Doyle (1990). Von jungen Hopfenpflanzen wurde Blattmaterial entnommen, für zwei Tage in einer Gefriertrocknungsanlage (Labconco, UniEquip, Kansas City, USA) im Vakuum bei $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 13 mbar getrocknet und anschließend in einer Kugelmühle (MM2000, Retsch, Haan, Deutschland) 2 min. gemahlen. Zu dem pulverisierten Material wurde 1,7 ml Extraktionspuffer gegeben und für 30 min. bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Warmluftschüttler (40 U/min, UniEquip, Planegg, Deutschland) inkubiert. Danach wurde 1 ml des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) versetzt und 10 min. im Überkopfschüttler (Reax 2, Heidolph, Schwabach, Deutschland)

geschwenkt. Die Phasentrennung erfolgte durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 4000 rpm. Die oberste Epiphase wurde in ein neues 2,2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben mit 2 µl RNase⁻ versehen und 30 min. bei 37 °C verdaut. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol (800-1000 µl) und 1/10 Volumen NaAc (3M, pH 5,2), in der Regel 80-100 µl. Zur Unterstützung des Fällungsprozesses wurden die Proben für 30 min. im Überkopfschüttler geschwenkt und anschließend durch Zentrifugieren (10 min. bei 10.000 rpm) sedimentiert. Zur Reinigung wurde das DNA-Pellet mit 1 ml EtOH (70 %) gewaschen, kurz geschwenkt und für 10 min. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet im Vakuumtrockner für 20 min. getrocknet, um das restliche Ethanol zu entfernen. Im letzten Schritt wurde die DNA in 150 µl TE-Puffer (pH=8) aufgenommen und über Nacht bei RT gelöst.

2.5.2 Isolation und Reinigung von RNA

2.5.2.1 Präparation von RNA aus Hopfenblättern

Für die RNA-Isolation wurden jeweils die Blätter der *in vitro*-Pflanzen unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff fein gemörsert. Die anschließende Extraktion der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des PURESCRIPT RNA Isolation Kits (Gentra Systems, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das erhaltene Pellet wurde in 200 µl RNA Hydration Solution oder alternativ in DEPC-Wasser gelöst und 30 min. auf Eis gelöst. Danach wurden die Proben in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Im nächsten Schritt wurde die Qualität der Roh-RNA auf einem 1,5%igem denaturierendem Formaldehyd-Agarosegel überprüft. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte im Photometer (Gene Quant DNA/RNA Calculator, Amersham Pharmacia, Schweden).

2.5.2.2 DNase-Verdau

Die Roh-RNA wurde einem DNaseI Verdau unterzogen, um eventuell noch vorhandene DNA vollständig zu entfernen. Dabei wurde das Enzym DNaseI (Roche) in Kombination mit einem nach Angaben von Sambrook et al. (1989) und den Herstellerangaben (Protocols and Application Guide, Promega Corporation, 1996) zusammengestellten Puffersystems verwendet. Für jede Probe wurde ein 200 µl Ansatz hergestellt, der aus einer 148 µl Gesamt-RNA Suspension mit einer Konzentration zwischen 50 und 150 ng/µl und dementsprechend 0,5-2 µl DNaseI (10 U/µl) bestand. Dadurch waren im Ansatz insgesamt 1 Unit DNaseI/µg

Gesamt-Nukleinsäuren. Weitere Komponenten im Ansatz waren 1x BSA, 50 mM Tris sowie 10 mM MgCl₂. Die Ansätze wurden mit dem Vortex gemischt und 20 min. bei 37 °C inkubiert (Thermoblock Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Bis zum nächsten Schritt der Reinigung wurden die Proben auf Eis gelagert.

2.5.2.3 RNA-Aufreinigung

Um Enzyme und Puffer zu entfernen und die RNA-Suspension aufzukonzentrieren, wurde der RNeasy® Mini Kit (Quiagen, Hilden) verwendet. Die Reinigung, welche auf der selektiven Bindung an eine Silica-Membran basiert, wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Auf die 200 µl Reaktionsansätze wurden 700 µl RLT Puffer und 500 µl EtOH (96-100 %) pipettiert, wodurch die Proben an das Säulenmaterial gebunden wurden. Nach der Zentrifugation (1 min bei 10.000 rpm) folgte ein erster Waschschriff mit RPE Puffer und nach einer weiteren Zentrifugation (1 min bei 10.000 rpm) ein zweiter Waschschriff (RPE Puffer), wobei die Waschlösungen nach jedem Waschschriff verworfen wurden. Die abschließende Zentrifugation wurde für 2 min. bei 15.000 rpm (Biofuge 17RS, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland) durchgeführt. Zur Elution der RNA von der Silica-Membran wurden die Proben nacheinander zweimal mit 15 µl DEPC-Wasser versetzt und die Eluate abschließend vereinigt. Die Qualität der RNA wurde auf einem 1,5%igem denaturierendem Formaldehyd-Agarosegel überprüft. Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde photometrisch bestimmt. Die Lagerung der gereinigten RNA-Proben erfolgte bei -80 °C.

2.5.3 cDNA-Synthese

2.5.3.1 Erststrangsynthese

Die cDNA-Synthese wurde etwas modifiziert mit dem SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Takahara Bio Company, Canada) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden 125 ng RNA pro Probe eingesetzt. Der Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese der cDNA wurde halbiert, d.h. es wurde nur die halbe Menge der laut Herstellerprotokoll benötigten Komponenten verwendet. In Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass auch bei der Verwendung der halben Menge eine ausreichende Menge an cDNA synthetisiert wird, und zugleich die Kosten der cDNA-Synthese erheblich gesenkt werden konnten.

Nach dem Mischen der Reaktionsansätze wurden die Proben für eine Stunde bei 42 °C inkubiert und anschließend im Maßstab 1:5 mit Te_{0,1} (10 mM Tris, pH 8; 0,1 mM EDTA) verdünnt.

2.5.3.2 Zweitstrangsynthese

Die „Long Distance“-PCR wurde mit dem Advantage™ 2 PCR Kit (Clontech, Takahara Bio Company, Canada) durchgeführt. Das Herstellerprotokoll wurde wieder leicht modifiziert, d.h. wie bei der Erststrangsynthese wurde der Reaktionsansatz auch bei der Zweitstrangsynthese halbiert. Für jede Probe wurden zwei 45 µl Reaktionsansätze angesetzt und jeweils 4 µl verdünnter Einzelstrang-cDNA genutzt.

Die Reaktionsansätze wurden im Thermocycler (PTC 200, MJ Research Inc., Waltham, USA) unter folgenden Parametern inkubiert:

- 1 min Denaturierung bei 95 °C
 - 15 sec bei 95 °C
 - 30 sec bei 65 °C
 - 6 min bei 68 °C
 - 4 °C Lagertemperatur
- } 20 Zyklen

2.5.3.3 cDNA-Reinigung

Für die Reinigung der cDNA wurden jeweils 25 µl der zwei Ansätze pro Probe vereinigt und 2,56 µl Proteinase K (15,6 mg/ml) zugegeben. Die Inkubation der Reaktionsansätze fand unter folgenden Bedingungen statt:

- 1 h bei 45 °C
- 10 min bei RT
- 9 min bei 90 °C
- 2 min auf Eis zum Abstoppen der Reaktion

Die anschließende Ethanolfällung erfolgte durch Zugabe von 22 µl 5M NH₄OAc und 210 µl EtOH_{abs} auf die Reaktionsansätze. Nach 30maligem Invertieren wurden die Proben für 20 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet für 10 min in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac., Jouan, Frankreich) getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 20 µl H₂O resuspendiert und die cDNA bei -20 °C gelagert.

Die Qualität der cDNA wurde in einem Agarosegel überprüft und die Konzentration der cDNA photometrisch ermittelt.

2.5.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde photometrisch mit dem Gene Quant DNA/RNA Calculator (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. cDNA-Proben wurden mit H₂O_{bidest}, RNA-Proben mit H₂O-DEPC auf ein Volumen von 70 µl verdünnt. Der Verdünnungsmaßstab betrug bei RNA-Proben 1:10, bei cDNA 1:20. Die Messung wurde bei einer Extinktion von 260 nm und LOD_{260nm}=1 bei 40 µg RNA/ml bzw. LOD_{260nm}=1 bei 50 µg cDNA/ml durchgeführt.

2.5.5 Markeranalysen

2.5.5.1 AFLP-Marker

Die AFLP Analyse erfolgte nach einem für Hopfen etablierten Protokoll (Hartl und Seefelder, 1998).

Die genomische Hopfen-DNA wurde mit den selten schneidenden Restriktionsenzymen *EcoRI* und *PstI* und dem häufig schneidenden Restriktionsenzym *MseI* verdaut, um möglichst viele Polymorphismen und damit eine gute Genomabdeckung zu erlangen. Nachfolgend sind die Reaktionsansätze für den Restriktionsverdau, die Adapter-Ligation, die Präamplifikation und die selektive Amplifikation aufgeführt (Tab. 8, 9 und 10). Alle Amplifikationen wurden in einem Thermocycler (PTC 100, PCT 200, Biozym bzw. Master Cycler epgradient, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 8: Ansatz für den Restriktionsverdau.

Reagenz	Volumen in µl	Endkonzentration
genomische DNA	10,0	10-50 ng/µl
NEB 2 Puffer	5,0	1x
BSA	0,5	0,1 mg/ml
<i>EcoRI/PstI</i>	0,25	0,1 U/µl
<i>MseI</i>	0,5	0,1 U/µl
H ₂ O bidest	33,75	
Summe	50,0	

Nach dem Mischen der Reaktionsansätze wurden die Proben im Thermocycler unter folgenden Bedingungen inkubiert:

- 3 h bei 37 °C
- 15 min bei 70 °C zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme
- 4 °C Lagertemperatur

Dem vorliegenden Restriktionsansatz wurden nachfolgend 10 µl des Ligationsansatzes zupipettiert:

Tabelle 9: Ansatz für die Adapter-Ligation.

Reagenz	Volumen in µl	Endkonzentration
<i>EcoRI</i> bzw. <i>Pst</i> -Adapter	1,0	0,5 µM
<i>Mse</i> -Adapter	1,0	5 µM
T4 DNA-Ligase Buffer	1,0	1x
T4-DNA-Ligase	0,2	8 U/µl
H ₂ O bidest	6,8	
Summe	10,0	

Das Restriktions-Ligations-Gemisch wurde für weitere drei Stunden bei 20 °C im Thermocycler inkubiert und bei 4 °C gelagert.

Die Präamplifikation wurde nach folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

Tabelle 10: Ansatz für die Präamplifikation.

Reagenz	Volumen in µl	Endkonzentration
DNA aus der Ligation	2,5	
dNTP'S	0,6	1,2 mM
PCR Puffer	1,0	1x
Enhancer	2,0	2x Taq
MgCl ₂	0,3	1,5 mM
<i>EcoRI</i> bzw. <i>Pst</i> -Primer	0,4	0,4 µM
<i>Mse</i> -Primer	0,4	0,4 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,0625	0,03125 U/µl
H ₂ O bidest	2,75	
Summe	10,0	

Die PCR-Bedingungen für die Präamplifikation waren wie folgt:

- 2 min Anfangsdenaturierung bei 94 °C
 - 1 min Denaturierung bei 94 °C
 - 1 min Primerannealing bei 56 °C
 - 2 min Primerextension bei 72 °C
- } 25 Zyklen
- 72 °C für 5 min
 - 4 °C Lagertemperatur

Nach der Präamplifikation wurde der Ansatz im Verhältnis 1:20 mit H₂O_{bidest} (190 µl) verdünnt und als Präamplifikat der selektiven Amplifikation zugeführt (Tab. 11).

Tabelle 11: Ansatz für die selektive Amplifikation.

Reagenz	Volumen in µl	Endkonzentration
DNA aus der Präamplifikation	3,0	
dNTPs	0,6	1,2 mM
PCR Puffer	1,0	0,4 µM
MgCl ₂	0,3	1,5 mM
<i>EcoRI</i> bzw. <i>Pst</i> -Primer	0,4	0,4 µM
<i>Mse</i> -Primer	0,4	0,4 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,0625	0,03125 U/µl
H ₂ O bidest	4,25	
Summe	10,0	

Die PCR-Bedingungen für die selektive Amplifikation waren folgendermaßen:

- 1 °C pro sec. auf 94 °C
 - 2 min Anfangsdenaturierung bei 94 °C
 - 30 sec Primerannealing bei 65 °C (-1 C°/Zyklus)
 - 1 °C pro sec auf 72 °C
 - 2 min Primerextension bei 72 °C
 - 30 sec Denaturierung bei 94 °C
 - 1 °C pro sec auf 56 °C
 - 30 sec Primerannealing bei 56 °C
 - 1 °C pro sec auf 72 °C
 - 2 min Primerextension bei 72 °C
 - 4 °C Lagertemperatur
- } 11 Zyklen
- } 22 Zyklen

Die Genotypisierung der Kartierungspopulationen wurde mit *EcoRI/MseI* (E-M) und *PstI/MseI* (P-M) AFLP-Primerkombinationen unter Verwendung der Standardliste für die AFLP-Primer-Nomenklatur durchgeführt (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/keygeneAFLPs.html>). Die Bezeichnung der AFLP-Marker in setzt sich aus der entsprechenden Primerkombination, gefolgt von der Fragmentgröße, angegeben in Basenpaaren, zusammen.

2.5.5.2 SSR-Marker

Alle bisher veröffentlichten Mikrosatelliten (Brady et al., 1996; Cerenak et al., 2004; Hadonou et al., 2004; Stajner et al., 2005; Jaske et al., 2008a und 2010) wurden auf Polymorphie zwischen den Kreuzungseltern getestet. Mit den polymorphen Mikrosatelliten wurden anschließend die Kartierungspopulationen genotypisiert.

Die Amplifikation der Mikrosatelliten erfolgte nach Brady et al. (1996) mit einigen Modifikationen (Tab. 12).

Tabelle 12: Ansatz für die SSR-Amplifikation.

Reagenz	Volumen in μl	Endkonzentration
DNA	3,0	1,5 ng/ml
dNTP'S	0,5	0,5 mM
PCR Puffer	2,0	1x
MgCl ₂	0,8	2 mM
Forward-Primer	0,5	0,2 μM
Reverse-Primer	0,5	0,2 μM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,05	0,0125 U/ μl
H ₂ O bidest	13,15	
Summe	20,0	

Die Bedingungen der PCR-Zyklen wurden wie folgt gewählt:

- 2 min Denaturierung bei 94 °C
 - 1 min Denaturierung bei 94 °C
 - 1 min Primerannealing bei 55 bzw. 60 °C
 - 2 min Primerextension bei 72 °C
 - 4 °C Lagertemperatur
- } 44 Zyklen

2.5.5.3 Identifizierung molekularer Marker nach dem Prinzip der „Bulked-Segregant-Analyse“

Die von Michelmore et al. (1991) und Giovannoni et al. (1991) entwickelte Bulk-Segregant-Analyse (BSA) stellt eine schnelle und einfache Methode zur Identifizierung von molekularen Markern dar, die mit spezifischen Genen gekoppelt sind. Die DNA von jeweils zehn resistenten und zehn anfälligen Genotypen wurde vereinigt und zusammen mit den Eltern molekulargenetisch untersucht.

2.5.6 Gelelektrophoretische Methoden

2.5.6.1 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA

Um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden, die das Laufverhalten der RNA-Moleküle negativ beeinflussen würden, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der RNA unter denaturierenden Bedingungen. Für die Gelelektrophorese wurden 1,5%ige Agarosegele

mit Zusatz von 17,7%igem Formaldehyd verwendet. Als Mastermix wurde 15,5 µl RNA-Beladungspuffer mit 4 µl Probe versetzt, der Ansatz anschließend für 5 min bei 55 °C im Thermocycler denaturiert und danach für 2 min auf Eis inkubiert. Der Gellauf erfolgte in 1 x RNA Elektrophoresebuffer für 10 min bei 100 V und anschließend 1 h bei 70 V in einer horizontalen Elektrophoresekammer (PEQLAB-Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland).

2.5.6.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von cDNA

Zur Überprüfung der cDNA wurden Gele aus 1,2%iger Agarose und TBE-Puffer hergestellt. Der Gellauf erfolgte in 1 x TBE Puffer in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 80 V für 10 min, danach für 30 min bei 60°C und für eine weitere Stunde bei 40 V. Als Größenmarker wurde der Smart Ladder eingesetzt. Vor dem Gelauftrag wurden die Proben mit 10 µl Loading Dye versetzt.

2.5.6.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Bei der AFLP-Analyse waren alle verwendeten *EcoRI*- und *PstI*-Primer am 5'-Ende mit Fluorescein markiert, bei der SSR-Analyse jeweils die entsprechenden Forward-Primer. Die Auftrennung aller amplifizierten Fragmente aus der AFLP- und SSR-Analyse erfolgte auf 5%igen denaturierenden Polyacrylamidgelen. Die Proben wurden vor dem Gelauftrag mit 10 µl Loading Dye versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Life Technologies, Model SA) bei 1580 V bei 50 Watt für 1,5 bis 2 h. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein Längenstandard auf jedem Gel mit aufgetragen.

2.5.7 Detektion und Fragmentanalyse

Die Detektion AFLP-Fragmente erfolgte mittels eines Fluoreszenz-Scanners (Typhoon 9200, Amersham, Braunschweig). Die Auswertung der AFLP-Marker wurde anschließend mit Hilfe des Programms Cross Checker (Buntjer und Otsen, 2000) durchgeführt. Die digitalen Bilder der Mikrosatelliten und der cDNA-AFLPs wurden visuell ausgewertet.

2.6 Datenauswertung

2.6.1 Molekulargenetische Kartierung

Die molekulargenetische Kartierung erfolgte mit dem Programm JoinMap® 3.0 (Plant Research International BV, Wageningen, Niederlande). JoinMap® ermöglicht eine Verrechnung molekularer Marker mit verschiedenen Segregationstypen in einer Nachkommenschaft heterozygoter Eltern und ist damit für stark heterozygote Kulturpflanzen wie den diözischen Hopfen optimal geeignet.

Es wurden die Marker dreier unterschiedlicher Segregationstypen verrechnet. In dem Segregationstyp Typ I $lm \times ll$ befinden sich ausschließlich Marker, die von der Mutter im Verhältnis 1:1 an die Nachkommenschaft (F_1 -Generation) weitergegeben werden. Hierbei ist die Mutter bezüglich des Markerlocus heterozygot (lm), der Vater hingegen homozygot (ll). Segregationstyp Typ II $nn \times np$ beinhaltet Marker, die ausschließlich vom Vater im Verhältnis 1:1 weitervererbt werden. Die Mutter ist dabei bezüglich des Markerlocus homozygot (nn), Vater heterozygot (np). Der Segregationstyp Typ III $hk \times hk$ besteht aus Markern, die sowohl bei der Mutter als auch beim Vater zu finden sind und im Verhältnis 3:1 in den Nachkommenschaften aufspalten. Bei dem Segregationstyp Typ IV $ab \times cd$ sind beide Eltern bezüglich des Markerlocus heterozygot, aber verschieden. Das Spaltungsverhältnis beträgt 1:1:1:1. Mit diesen codominanten Markern können bis zu vier verschiedene Allele an einem Genort detektiert werden. Das Spaltungsverhältnis bei dem codominanten Markertyp Typ V $ef \times eg$ liegt bei 1:1:1:1. Diese codominanten Marker detektieren bis zu drei verschiedene Allele an einem Genort. Alle Marker wurden von JoinMap® mittels Chi-Quadrat (χ^2) Test auf eine Abweichung vom Spaltungstyp überprüft. Die Verrechnung der Markerabstände fand unter Verwendung der Kosambi Funktion statt. Für die Gruppierung der Marker wurde ein LOD Wert von 3 bzw. 4 gewählt. Der LOD-Wert ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Kopplung zweier Marker. Ein LOD-Wert von 3.0 bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit der Kopplung zwischen zwei Markern 10^3 -fach größer ist als die Wahrscheinlichkeit für freie Spaltung.

2.7 Fragmentanalyse

2.7.1 Fragmentisolation

Interessante cDNA Fragmente wurden nochmals auf einem 5%igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die so gewonnenen cDNA-Fragmente wurden in 50 µl H₂O_{bidest} (MilliQ) eluiert, über Nacht inkubiert und für 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Schließlich wurden die Fragmente in einer PCR mit Adapter-spezifischen Primern reamplifiziert. Für jedes Fragment wurden zwei 60 µl Ansätze mit folgender Zusammensetzung hergestellt: 0,5 µl des Eluats, je 0,2 µl des preselektiven *EcoRI*-Primers und des selektiven *Mse*-Primers, 0,2 mM von jedem dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 Units *Taq*-Polymerase und 1 x PCR Puffer. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 60 µl aufgefüllt.

Das PCR-Programm war identisch mit dem der selektiven Amplifikation (Kapitel 2.5.5.1).

Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mittels QIAquick® PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt und die Konzentration photometrisch erfasst (Kapitel 2.5.4).

2.7.2 Klonierung von cDNA-AFLP-Fragmenten

Die Ligation und Transformation wurde mit dem Qiagen® PCR Cloning^{Plus} Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Als Klonierungsvektor wurde der pDrive Cloning Vektor (50 ng/µl), ein T/A Vektor, verwendet. Die gereinigten PCR-Fragmente (34 ng/ µl) wurden mit Vektor DNA ligiert und in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Der Transformationsansatz wurde mit 11,25 µl Soc-Medium (Quiagen, Hilden, Deutschland) versetzt und anschließend in drei verschiedenen Volumina (20, 50, 80 µl) ausplattiert. Um die inserthaltigen Transformanden identifizieren zu können, wurden die Bakterienkolonien, neben der Selektion auf Ampicillinresistenz, parallel einer Blau-Weiß Selektion unterzogen. Dazu wurden die Bakterienzellen auf LB_{Amp}-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Rekombinante Bakterienkolonien, die die Fremd-DNA integriert hatten, wiesen eine weiße Färbung auf. Diese wurden mit einem Zahnstocher gepickt und in 10 µl MilliQ-Wasser überführt. Es folgte eine PCR mit dem Ori Master Kit (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Zur Überprüfung der Insertion wurde ein *EcoRI*-Verdau der PCR-

Fragmente für 3 h bei 37 °C durchgeführt und der Ansatz auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt.

Der Reaktionsansatz für den *EcoRI*-Verdau hatte ein Volumen von 20 µl und setzte sich wie folgt zusammen: 4,0 µl PCR-Produkt, 5 Units des *EcoRI*- Restriktionsenzym, sowie 1× NEB Puffer *EcoRI*.

Da eine Bande aus einem oder mehreren unterschiedlichen Genfragmenten bestehen kann, wurden für jede ausgeschnittene Bande jeweils drei Klone der Reamplifikation sequenziert, um falsche Sequenzen auszuschließen.

2.8 Ableitung genomischer Marker aus cDNA-AFLP-Markern

Mit der cDNA-AFLP Methode ist es möglich Polymorphismen zu detektieren, die sowohl auf Expressionsunterschiede als auch auf Sequenzunterschieden innerhalb der Restriktionsschnittstellen oder Primerbindungsstellen beruhen können. Um zu sehen, ob der Polymorphismus auch zwischen dem anfälligen und dem resistenten Elter zu detektieren ist, wurden Primer für die interessanten TDFs (transcript derived fragment) mit der folgenden Formel mit dem Programm Vektor NTI konstruiert:

$$T_m = \text{Anzahl (A+T)} \times 2 \text{ (}^\circ\text{C)} + \text{Anzahl (G+C)} \times 4 \text{ (}^\circ\text{C)}.$$

Dabei sollten folgende Bedingungen erfüllt sein:

- Schmelztemperatur zwischen 50 °C und 60 °C
- Primer zwischen 18 und 22 bp lang
- am 3' Ende kein C
- GC-Gehalt bei ca. 50 %
- Unterschied der Schmelztemperatur zwischen „Forward“- und „Reverse“- Primer nicht mehr als 2 °C

Die entwickelten Primer wurden in einer Gradienten-PCR mit einem Temperaturgradienten zwischen 45-60 °C getestet. Als Prüfglieder wurde die genomische DNA der Eltern verwendet. Der Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 20 µl und entsprach im Wesentlichen dem Ansatz der AFLP-Analyse.

Die PCR-Bedingungen für die selektive Amplifikation waren folgendermaßen:

- 2 min Anfangsdenaturierung bei 94 °C
 - 30 sec Denaturierung bei 94 °C
 - 30 sec Primerannealing bei 45-60 °C
 - 2 min Primerextension bei 72 °C
 - 4 °C Lagertemperatur
- } 33 Zyklen

Das PCR-Produkt wurde auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen.

2.9 DNA Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierung der Plasmide erfolgte nach der Sanger-Methode (Sanger et al., 1977) und wurde bei der Firma MWG Biotech GmbH, Ebersberg, Deutschland (<http://www.mwg-biotech.com>) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Softwarepaket Vektor NTI AdvanceTM 10.3 (Invitrogen, Carlsbad, Canada) analysiert und mit der Software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., 1990) mit den Gendatenbanken NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) auf Ähnlichkeiten mit bereits bekannten Sequenzen überprüft, um mögliche Hinweise auf bereits bekannte Resistenzmechanismen zu finden oder Homologien zu anderen an Stress- und Abwehrreaktionen beteiligten ESTs zu identifizieren. Die statistische Vergleichsgröße in BLAST ist der E-Wert einer Sequenz. Er steht für die zu erwartende Anzahl von Sequenzen in einer zufälligen Datenbank gleicher Größe, die den Motiven ebenso gut entsprechen würde, wie die Suchsequenz und ist gleich dem Produkt aus den kombinierten p-Werten der Sequenz und der Gesamtzahl aller Sequenzen in der Datenbank. Der p-Wert ist dabei definiert als Wahrscheinlichkeit, dass eine Zufallssequenz derselben Länge eine gleich gute oder bessere Übereinstimmung zwischen Suchsequenz und Treffer erzielt.

3 Ergebnisse

3.1 Resistenzscreening und Spaltungsanalyse der Kartierungspopulationen

Seit 2002 stehen für das Blatt-Resistenzprüfsystem in der Petrischale elf verschiedene Einzelsporisolate von *Podosphaera macularis* spp. *humuli* als Inokulationsmaterial mit charakterisierten Virulenzeigenschaften zur Verfügung (Tab. 7). Zur Differenzierung mehltaresistenter und mehltuanfälliger Nachkommen der Kartierungspopulationen, wurden die Blätter der Nachkommen entsprechend dem Labor-Blatt-Test mit dem Mehltau-Einzelsporisolat Hüll Züchtung 9 (Hu9) künstlich im Labor inokuliert und anschließend die Reaktion mit 0 für resistent bzw. 1 für anfällig bonitiert. Zur Einstufung /Einschätzung der Resistenz bzw. Anfälligkeit gegenüber Echtem Mehltau aller Individuen als Voraussetzung für die Spaltungsanalyse wurden neben den F₁-Nachkommenschaften der Kreuzungen, auch die Kreuzungseltern (anfällig: Hallertauer Gold, Opal, 87/024/027, 87/024/056; resistent: 92/076/721, WH18/97/003, WH18/97/006, WH18/97/007, WH18/97/008, Wye Target) und als Kontrolle die hoch anfällige Sorte Northern Brewer mit dem gleichen Isolat beimpft (Abb. 8).



Abbildung 8: Mehltauscreening mit dem „Blatt-Resistenzprüfsystem in der Petrischale“.

Alle Sämlinge des Wildhophfens aus der Eifel zeigten bis 2008 gegenüber allen bisher bekannten Mehltaurassen vollständige Resistenz, d.h. für diese Resistenz gab es zum Zeitpunkt der Durchführung der Analysen kein virulentes Isolat. Für das Resistenzscreening von WH18 wurde das Isolat Hu9 ($\nu 3$, νB Virulenztyp) eingesetzt. Die Bonitur erfolgte nach acht Tagen.

Die Spaltungsanalyse (resistent : anfällig) der F_1 -Generation aus den Kreuzungen mehltaresistenter und mehltuananfälliger Genotypen diente zur Überprüfung der Hypothese, ob es sich bei der Resistenzausprägung von R_{WH18} um ein dominantes Gen handelt oder ob mehrere Gene beteiligt sind. Mit einem χ^2 -Anpassungstest wurde untersucht, ob es signifikante Abweichungen ($p = 5\%$) der beobachteten von den theoretisch zu erwartenden Werten gibt.

Bei allen Kreuzungen zwischen einem mehltaresistenten und einem mehltuananfälligen Elter ergab die Auswertung der Boniturdaten eine 1:1 Spaltung in den Nachkommenschaften (Tab. 13). Damit konnte erstmalig die monogene, autosomale und dominante Vererbung des WH18-Mehltaresistenzgens nachgewiesen werden.

Tabelle 13: Spaltungsverhältnisse der Kartierungspopulationen resistent x anfällig nach Einschätzung der Resistenz über das Blattprüfsystem in der Petrischale. df = Freiheitsgrad, n.s. = nicht signifikant.

Kartierungs- population	Anzahl der Sämlinge (F1-Pop.)	Phänotyp (resistent : anfällig)		erwartet	χ^2	df	Signi- fikanz
Hallertauer Gold x WH18/97/003 (R_{WH18})	140	80	60	1:1	2,86	1	n.s.
WH18/97/006 (R_{WH18}) x 87/024/027	136	74	62	1:1	1,06	1	n.s.
87/024/056 x WH18/97/007 (R_{WH18})	140	74	66	1:1	0,46	1	n.s.
Opal x WH18/97/003 (R_{WH18})	140	67	73	1:1	0,13	1	n.s.

Durch die gezielte Kreuzung zweier resistenter Eltern in den Populationen WH18/97/008 (R_{WH18}) x 92/076/721 ($R_{JAP-C845}$) und Wye Target (R_2) x WH18/97/003 (R_{WH18}) konnten

zusätzlich Populationen erstellt werden, in denen zwei unabhängig voneinander vererbte Resistenzgene zur Wirkung kommen.

Die Spaltungsanalyse der F_1 -Generation aus den Kreuzungen mehlttauresistenter x mehlttauresistenter ($R_{WH18} \times R_{JAP-C845}$ und $R_2 \times R_{WH18}$) Genotypen nach der Beimpfung mit den Isolaten Hu9 und WH52/1 bei der Kreuzung WH18/97/008 x 92/076/721 bzw. den Isolaten Hu9 und E10 bei der Kreuzung Wye Target x WH18/97/003 ergab ein Spaltungsverhältnis von 3:1 (resistent : anfällig). Das Spaltungsverhältnis von 3:1 bestätigt die Vermutung, dass jeweils die zwei Resistenzgene bei den Ausgangseltern heterozygot vorliegen (Abb. 9).

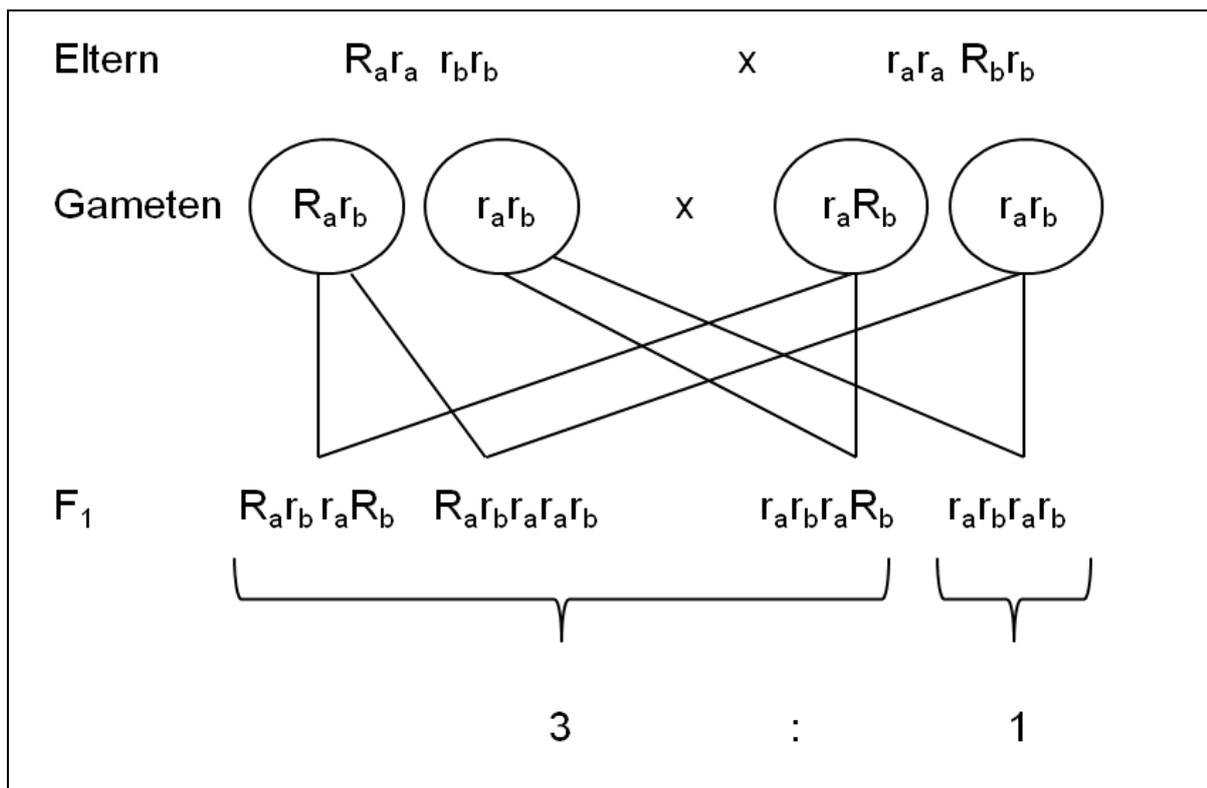


Abbildung 9: Spaltungsverhältnis zweier heterozygot vorliegender Resistenzgene in den Kartierungspopulationen WH18/97/008 (R_{WH18}) x 92/076/721 ($R_{JAP-C845}$) und Wye Target (R_2) x WH18/97/003 (R_{WH18}).

Somit fanden die Spaltungen eine gute Übereinstimmung mit dem theoretisch zu erwartenden Spaltungsverhältnis von 3:1 (Tab. 14). Mit diesen Ergebnissen konnte die monogene Resistenz auch für die Resistenzgene R_2 (Wye Target) und $R_{JAP-C845}$ (92/076/721) bestätigt bzw. nachgewiesen werden.

Tabelle 14: Spaltungsverhältnisse der Kartierungspopulationen resistent x resistent nach Einschätzung der Resistenz über das Blattprüfsystem in der Petrischale. df = Freiheitsgrad, n.s. = nicht signifikant.

Kartierungs- population	Anzahl der Sämlinge (F1-Pop.)	Phänotyp (resistent : anfällig)		erwartet	χ^2	df	Signifi- kanz
WH18/97/008 (R_{WH18}) x 92/076/721 (<math>R_{JAP- C845}</math>)	131	104	27	3:1	1,76	1	n.s.
Wye Target (R_2) x WH18/97/003 (R_{WH18})	140	109	31	3:1	0,61	1	n.s.

In der Kreuzung Wye Target x WH18/97/003 erhielten 109 Sämlinge (Hu9; $\nu 3$, νB Virulenz-Typ) die Boniturnote 0 und waren damit als resistent einzustufen. 31 Sämlinge wurden mit 1 bonitiert und zeigten eine starke Besiedlung mit Mehltau. Zur Identifizierung derjenigen Pflanzen, die sowohl die R_{WH18} als auch die doppelte Resistenz ($R_{WH18}+R_2$) trugen, wurden die in dieser Kreuzung als resistent eingestuft Pflanzen nochmal beprobt und diesmal mit dem Isolat E10 ($\nu 1$, $\nu 2$, $\nu 3$, $\nu 5$, νB Virulenz-Typ) beimpft. Das Isolat E10 bricht die R_2 -, aber nicht die R_{WH18} -Resistenz. Mit der anschließenden Bonitur von 0= resistent bzw. 1= anfällig konnten eindeutig diejenigen Pflanzen charakterisiert werden, bei denen die Resistenz entweder auf dem R_{WH18} -Gen, Boniturnote 0 nach Beimpfung mit E10, oder dem R_2 -Gen, Boniturnote 1 nach Beimpfung mit E10, beruhte (Tab. 15). Da die WH18-Resistenz bis 2008 von keinem Isolat gebrochen werden konnte, konnte bei diesem Test nicht zwischen Pflanzen differenziert werden, die alleinig das R_{WH18} -Gen bzw. beide Resistenzgene ($R_{WH18}+R_2$) trugen. Eine einzige Pflanze von den 109 als resistent eingestuft Pflanzen, zeigte eine widersprüchliche Bonitur nach der Beimpfung mit dem Isolat E10. Diese Pflanze erhielt die Boniturnote 1 bei der ersten Untersuchung, bei der zweiten Untersuchung die Boniturnote 0. Dieses widersprüchliche Ergebnis kann möglicherweise durch ungeeignetes Testmaterial, d.h. in diesem Fall durch z.B. zu altes Blattmaterial, verursacht worden sein. Aus diesem Grund konnte diese Pflanze nach dem Mehltauscreening mit dem „Blatt-Resistenzprüfsystem“ noch nicht den entsprechenden Resistenzgenen zugeordnet werden.

Tabelle 15: Spaltungsanalyse der Kartierungspopulation Wye Target x WH18/97/003.

Kartierungspopulation	Anzahl der Sämlinge (F₁-Pop.)	Phänotyp anfällig	Phänotyp resistent	R_{WH18} + R₂ (Doppelte Resistenz)	Nur R₂
Wye Target (R₂) x WH18/97/003 (R_{WH18})	140	31	109	64	44

Nach dem gleichen Prinzip wurde mit der Kartierungspopulation, in die neben der WH18-Resistenz auch die Resistenz von JAP-C845 eingekreuzt hatte, vorgegangen. Hierbei wurde zur Überwindung der JAP-C845-Resistenz das Isolat WH62/1 (*vI*, *v3*, *vB* Virulenz-Typ) eingesetzt. Auch in diesem Fall konnte nicht zwischen Pflanzen, die die doppelte Resistenz bzw. die einfache, nur auf WH18 beruhende Resistenz besitzen, differenziert werden (Tab. 16).

Tabelle 16: Spaltungsanalyse der Kartierungspopulation WH18/97/003 x 92/076/721.

Kartierungspopulation	Anzahl der Sämlinge (F₁-Pop.)	Phänotyp anfällig	Phänotyp resistent	R_{WH18} + R_{JAP-C845} (Doppelte Resistenz)	Nur R_{JAP-C845}
WH18/97/008 (R_{WH18}) x 92/076/721 (R_{JAP-C845})	131	27	104	81	23

Anhand der Boniturdaten (nicht gezeigt) konnte die Rassenspezifität der Resistenzgene nachgewiesen werden. Diese Rassenspezifität ist ein wichtiges Merkmal qualitativer Resistenz.

Zur Verifizierung der Daten wurden die Individuen der Sämlingspopulation WH18/97/008 x 92/076/721 im darauffolgenden Jahr erneut mit Mehltau inokuliert. So konnte die Wirksamkeit der Resistenzgene unter Gewächshausbedingungen auch im Jahr 2005 bestätigt werden.

3.2 Identifizierung molekularer Mehltaresistenzmarker beim Hopfen

Zur Identifizierung von molekularen Markern, die mit der Resistenz gegenüber Echten Mehltau gekoppelt/assoziiert sind, wurden durch die Kreuzung eines resistenten und eines anfälligen Elters spaltende Kartierungspopulationen von je etwa 140 Individuen erstellt. Als Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Identifizierung von DNA-Markern, die mit

spezifischen Resistenzgenen gekoppelt sind, gilt die eindeutige Differenzierung resistenter und anfälliger Individuen. Mit Hilfe der „detached leaf assay“-Methode wurden Blätter der Sämlinge künstlich mit Mehltau inokuliert und anschließend hinsichtlich ihrer Resistenzreaktion mit 0= resistent oder 1= anfällig bonitiert.

Nachdem die Wirkung eines dominanten Resistenzgenes R_{WH18} bzw. $R_{JAP-C845}$, durch Spaltungsanalysen (Tab. 13 und 14) festgestellt worden war, wurde die molekulare Analyse der Kartierungspopulationen durchgeführt.

3.2.1 Molekulare Analyse zur Identifizierung von Mehltaresistenzmarkern

Es wurden zwei Techniken eingesetzt, um molekulare Resistenzmarker zu identifizieren: die AFLP-Methode und die SSR-Analyse. Beide molekularen Techniken wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Zuerst wurden zwei DNA-Pools gebildet. Der eine Pool bestand aus der DNA von zehn mehltaresistenten Sämlingsindividuen, der andere Pool wurde aus zehn mehltauanfälligen Sämlingsindividuen gebildet. Mit diesen Pools wurde die sog. Bulked-Segregant-Analyse (BSA) durchgeführt.
2. Die genomische DNA beider Pools und der jeweiligen Eltern der Kartierungspopulationen wurden mit AFLP-Primern bzw. Mikrosatelliten auf Polymorphismen hin untersucht.
3. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die als polymorph selektierten Marker bei der gesamten Sämlingsnachkommenschaft auf Polymorphismen untersucht.
4. Lokalisierung der Resistenzmarker auf den Kopplungsgruppen.

3.2.1.1 Identifizierung von AFLP-Markern für das Resistenzgen R_{WH18}

Die Markerentwicklung für das Resistenzgen R_{WH18} wurde mit den drei Kreuzungen WH18/97/006 (R_{WH18}) x 87/024/027, Hallertauer Gold x WH18/97/003 (R_{WH18}) und 87/024/056 x WH18/97/007 (R_{WH18}) durchgeführt. Die Auswahl der jeweils zehn resistenten und zehn anfälligen Pflanzen zur Bildung der Pools beruhte auf den Ergebnissen aus dem vorangegangenen Mehltaresistenz-Tests. Da nach einem Screening von 100 *EcoRI/MseI* AFLP-Primerkombinationen kein Marker, der mit der Mehltaresistenz bzw. -anfälligkeit

korreliert war, gefunden werden konnte, wurde die Suche mit einem neuen Enzymsystem mit den Restriktionsenzymen *PstI/MseI* fortgesetzt. Beim Poolscreening mit diesem Enzymsystem kamen etwa 100 weitere AFLP-Primerkombinationen zum Einsatz. Aus diesen Primerkombinationen konnten die zwei Kombinationen PxxMxx bzw. PxxMxx gefunden werden, die ein zusätzliches Amplifikationsfragment bei 292 bzw. 290 bp bei den resistenten Individuen (resistenter Elter + resistenter Pool) in allen drei Kreuzungen zeigten (Abb. 10).

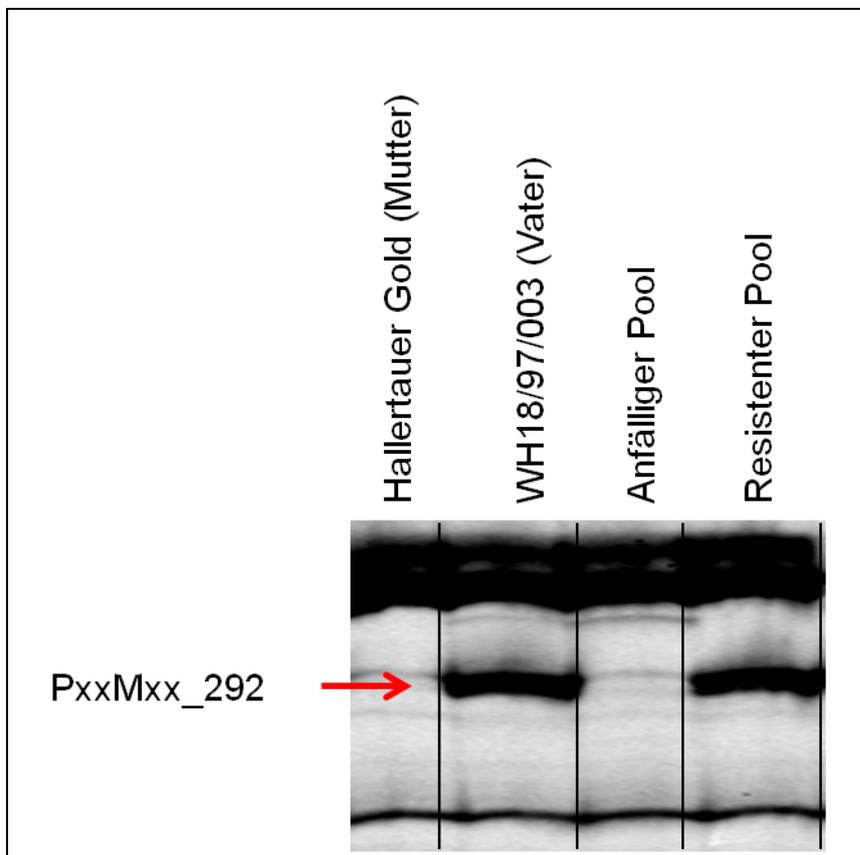


Abbildung 10: Ausschnitt aus einem Poolscreening-Gel in der Kartierungspopulation Hallertauer Gold x WH18/97/003. Zusätzliches Amplifikationsprodukt bei dem resistenten Vater WH18/97/003 und zehn gepoolten resistenten Nachkommen bei 292 bp.

Die 1:1-Spaltung der beiden Resistenzmarker konnte über einen χ^2 -Test bestätigt werden (Tab. 17).

Tabelle 17: Spaltung der AFLP-Marker PxxMxx_292 und PxxMxx_290 in der Kartierungspopulation Hallertauer Gold x WH18/97/003.

Locus	Segregations- typ	erwartete Segregation	beobachtete Segregation	χ^2	Signifikanz	Abweichler
PxxMxx_292	<nnxnp>	1:1	61:79	2,3	n.s.	0
PxxMxx_290	<nnxnp>	1:1	60:79	2,6	n.s.	0

Die beiden Resistenzmarker zeigten sich nach einem Screening der gesamten F_1 -Nachkommen der sechs untersuchten Kartierungspopulationen (Tab. 13 und 14) in allen als resistent eingestuften Genotypen. In den als anfällig bonitierten Individuen bzw. den nicht die R_{WH18} -tragenden Eltern konnte der Resistenzmarker nie nachgewiesen werden (Abb. 11).

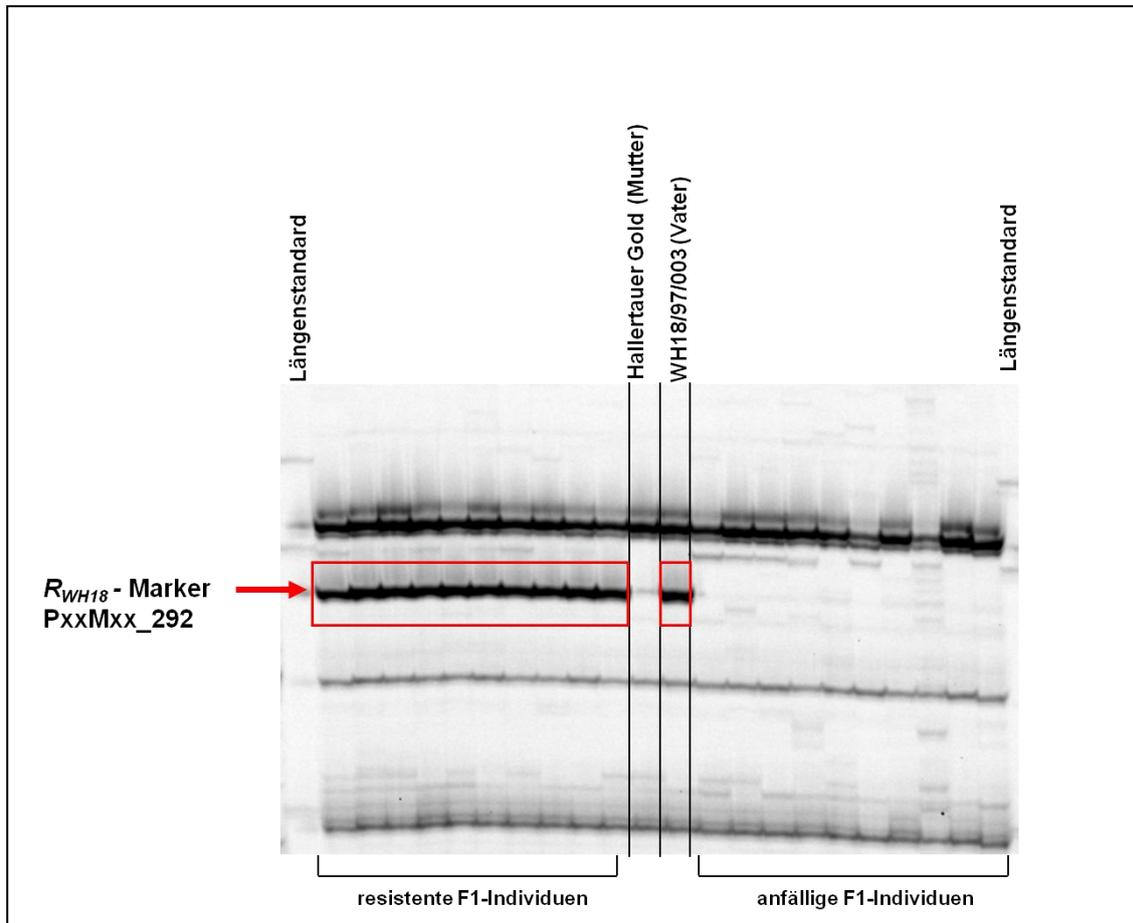


Abbildung 11: Segregation des R_{WH18} -AFLP-Markers PxxMxx_292 in der Kreuzung Hallertauer Gold x WH18/97/003.

3.2.1.2 Identifizierung von AFLP-Markern für das Resistenzgen $R_{JAP-C845}$ in der Kartierungspopulation WH18/97/008 x 92/076/721 ($R_{JAP-C845}$)

Durch den Einsatz des avirulenten Isolates WH62/1 (vI , $v2$, vB -Virulenz-Typ) im Mehltauscreening mit dem „Blatt-Resistenzprüfsystem“ konnten in der Kreuzung WH18/97/008 x 92/076/721 ($R_{JAP-C845}$) eindeutig 23 Pflanzen identifiziert werden, bei denen die Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau auf dem Resistenzgen $R_{JAP-C845}$ beruht. Aus diesen 23 Pflanzen wurden zehn Pflanzen ausgewählt und daraus der resistente Pool gebildet. Der anfällige Pool bestand aus zehn Pflanzen, die nach Beimpfung mit den beiden Isolaten (Hu9, $v3$, vB Virulenz-Typ, und WH62/1) einen starken Befall mit Mehltau zeigten. Aus 100

EcoRI/MseI AFLP-Primerkombinationen konnte eine Kombination (ExxMxx) gefunden werden, die ein zusätzliches Amplifikationsfragment bei 423 bp nur bei den resistenten Individuen (inkl. resistenter Elter + resistenter Pool) zeigte. Beim anfälligen Pool und bei dem mütterlichen Kreuzungspartner WH18/97/008, der kein Träger der *R_{JAP-C845}*-Resistenz ist, fehlte dieses Fragment. In dem anschließenden Screening aller Individuen der Kartierungspopulation zeigte sich, dass die als *R_{JAP-C845}*-resistent eingestuften Pflanzen den *R_{JAP-C845}*-Marker aufweisen, d.h. der Marker steht in Attraktion zum Resistenzgen (Abb. 12). Nur in einer als resistent eingestuften Pflanze, fehlte der *R_{JAP-C845}*-Marker. Hier muss ein Kopplungsbruch stattgefunden haben. In den als anfällig bonitierten Individuen zeigte sich der Resistenzmarker nie (Abb. 12).

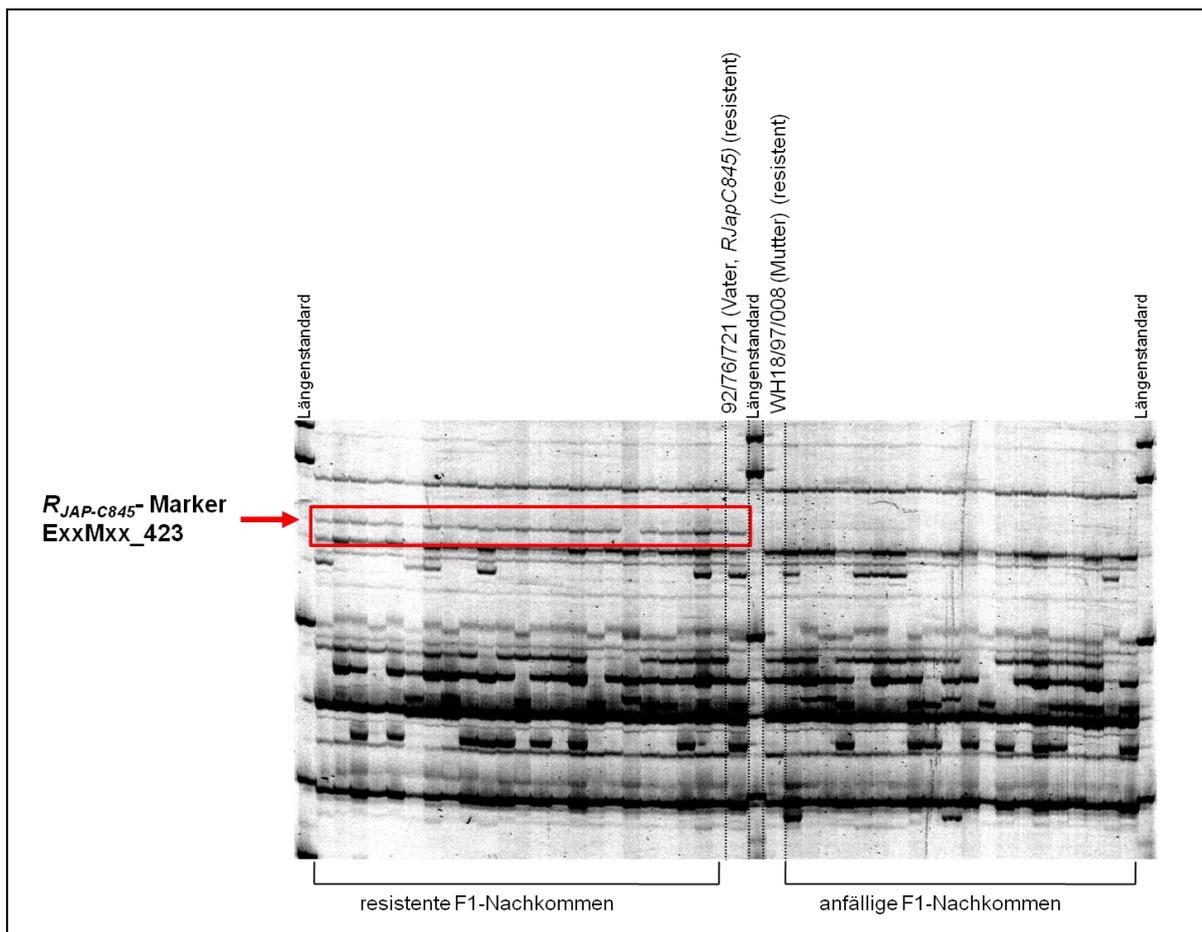


Abbildung 12: Segregation des AFLP-Markers ExxMxx_423 in der Kreuzung WH18/97/008 (*R_{WH18}*) x 92/076/721 (*R_{JAP-C845}*). Der Marker ExxMxx_423 stellt den Marker für die *R_{JAP-C845}*-vermittelte Resistenz dar.

Die für den Resistenzlocus *R_{JAP-C845}* zu erwartenden Spaltung der Marker konnte über einen χ^2 -Test bestätigt werden (Tab. 18).

Tabelle 18: Spaltung des $R_{JAP-C845}$ -AFLP-Markers ExxMxx_423 in der Kartierungspopulation WH18/97/008 x 92/076/721 ($R_{JAP-C845}$).

Locus	Segregations- typ	erwartete Segregation	beobachtete Segregation	χ^2	Signifikanz	Abweichler
ExxMxx_423	<nnxnp>	1:1	64:66	0,0	n.s.	1

In der anschließenden Kopplungsanalyse (JoinMap® 3.0) wurden 131 Individuen der F_1 -Population aus WH18/97/008 x 92/076/721 mit 175 AFLP-Markern und einem Mikrosatelliten-Marker verrechnet. Der Resistenzmarker für das Resistentgen $R_{JAP-C845}$ war auf der Kopplungsgruppe sechs der männlichen Karte lokalisiert. Die aus den Rekombinationsraten ermittelte genetische Distanz zwischen dem identifizierten AFLP-Marker (ExxMxx_423) und dem Resistenzlocus JAP-C845 betrug 0 cM, d.h. der Marker scheint auf dem Resistenzlocus oder ganz in der Nähe zu liegen. Ein weiterer AFLP-Marker konnte in einem Abstand von 5 cM und ein Mikrosatelliten-Marker im Abstand von 6 cM kartiert werden (Abb. 13).

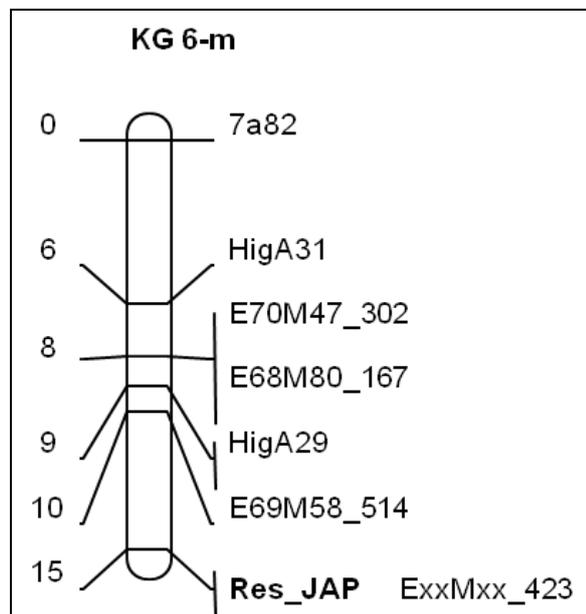


Abbildung 13: Kopplungsanalyse des AFLP-Markers ExxMxx_423 in der F_1 -Nachkommenschaft aus der Kreuzung WH18/97/008 x 92/076/721 ($R_{JAP-C845}$) um die Region des Mehltreueresistenzlocus $R_{JAP-C845}$. Es wurde ein LOD-Wert von 3.0 gewählt.

3.2.1.3 AFLP-Marker für die Resistenzgene R_{WH18} und R_2 in der Kreuzung Wye Target x WH18/97/003

Bei der Kartierung der Kreuzung Wye Target x WH18/97/003 mit 28 *EcoRI/MseI* und zwei *PstI/MseI* Primerkombinationen konnte die Primerkombination PxxMxx gefunden werden, die sowohl bei 292 bp einen Marker für die Resistenz aus dem Wildhopfen Eifel als auch bei 201 bp einen Marker für die R_2 -Resistenz detektierte (Abb. 14). Von den 109 mit dem Blatt-Resistenzprüfsystem unter Verwendung der Mehltausolate Hu9 ($v3$, vB Virulenz-Typ) und E10 ($v1$, $v2$, $v3$, $v5$, vB Virulenz-Typ) als resistent eingestuften Individuen konnten mit Hilfe der identifizierten Marker (Abschnitt 3.1, Tab. 15) nun diejenigen Pflanzen identifiziert werden, die beide Resistenzgene besitzen (Abb. 14).

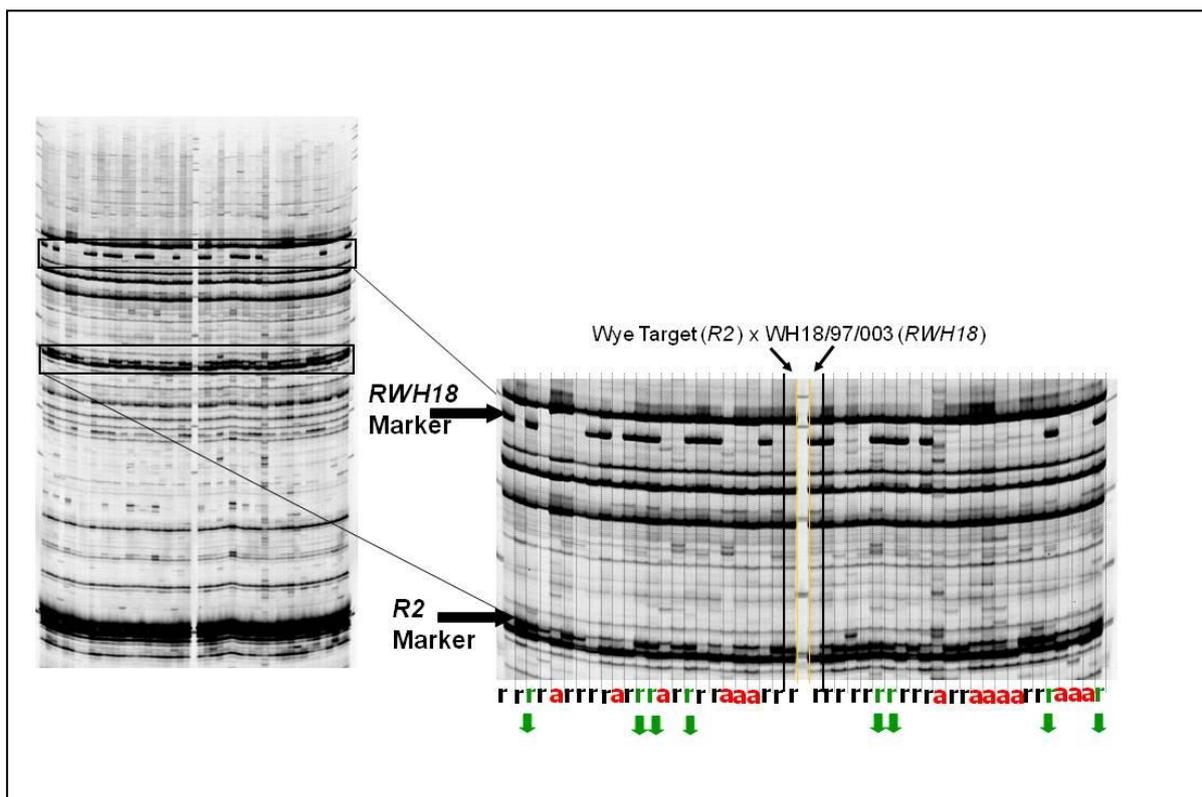


Abbildung 14: Pyramidisierung der Resistenzgene R_2 und R_{WH18} in der Kreuzung Wye Target x WH18/97/003. r = einfache Resistenz (entweder R_2 oder R_{WH18} -Resistenz), r = doppelte Resistenz (R_2 und R_{WH18}), a = keine Resistenzgene (anfällige Genotypen).

Bei 36 Individuen konnte das Vorhandensein von beiden Resistenzgenen detektiert werden. Durch die Detektion der molekularen Marker konnte die erfolgreiche Pyramidisierung von zwei Resistenzgenen in diesen Individuen nachgewiesen werden (Abb. 15).

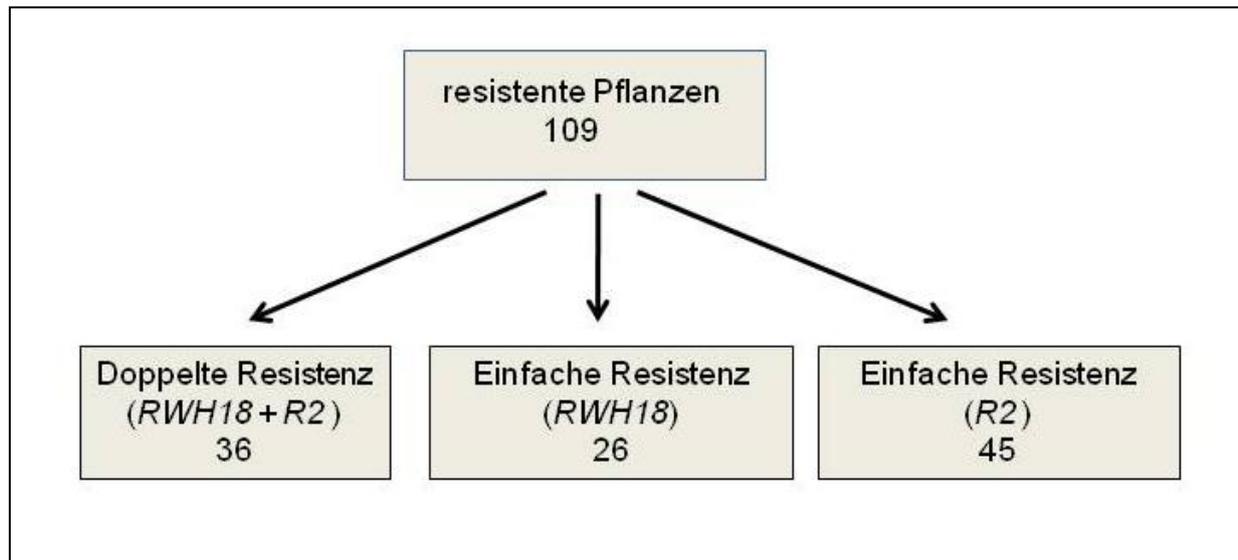


Abbildung 15: Verteilung der Resistenzgene R_2 und R_{WH18} in der Kreuzung Wye Target x WH18/97/003. Zwei Individuen konnten nicht ausgewertet werden.

3.2.1.4 AFLP-Marker für das Resistenzgen von R_{WH18} und $R_{JAP-C845}$ in der Kreuzung WH18/97/008 x 92/076/721

Die gesamte F_1 -Population aus 131 Individuen wurde mit dem Marker für die Resistenz aus dem Wildhopfen Eifel (PxxMxx_292) und dem Marker aus dem japanischen Wildhopfen (ExxMxx_423) gescreent. Von den 104 mit dem Blatt-Resistenzprüfsystem mit den zwei Mehltausisolaten Hu9 ($v3$, vB Virulenz-Typ) und E10 ($v1$, $v2$, $v3$, $v5$, vB Virulenz-Typ) als resistent eingestuft Individuen (Abschnitt 3.1, Tab. 16) konnten mit Hilfe der Marker nun diejenigen Pflanzen identifiziert werden, die beide Resistenzgene besitzen. 43 Individuen trugen die doppelte Resistenz, 38 Individuen die R_{WH18} -Resistenz und 23 die $R_{JAP-C845}$ -Resistenz. Die erfolgreiche Pyramidisierung von zwei Resistenzgenen in einem Individuum konnten auch in dieser Kartierungspopulation nachgewiesen werden.

3.2.2 Verifizieren der WH18-Resistenzmarker in weiteren WH18-tragenden Zuchtstämmen

2006 wurden weitere Hüller Zuchtstämme auf ihre Resistenzreaktion hinsichtlich des Echten Mehltaus im Gewächshaus untersucht. Kein Zuchtstamm zeigte einen Befall mit *Podosphaera macularis* ssp. *humuli*. Daher wurden alle als resistent eingestuft. Zur Überprüfung der universellen Einsetzbarkeit des WH18-Resistenzmarkers PxxMxx_290 wurden die Zuchtstämme im Jahr 2006 mit dem Marker gescreent. Der Marker konnte in allen

Zuchtstämmen, die mit dem Wildhopfen Eifel gekreuzt wurden, nachgewiesen werden (Tab. 19).

Tabelle 19: Verifizierung des WH18-Markers in männlichen und weiblichen WH18-tragenden Hopfen-Zuchtstämmen des Hüller Zuchtmaterials. m = männlich, w = weiblich, GH= Gewächshaus, res.= resistent, 1= Resistenzmarker WH18 ist im Zuchtstamm vorhanden.

Daten zum Zuchtstamm				Mehltau- bonitur	Marker- analyse
Stamm	Ge- schlecht	Mutter	Vater	GH	WH18 Marker
2002/026/505	m	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2002/026/812	m	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2002/026/816	m	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2002/026/821	m	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2002/026/830	m	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2002/026/831	m	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2002/026/845	m	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2002/026/847	m	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2002/026/854	m	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2004/025/Q100	m	Hallertauer Gold	WH18/97/003	res.	1
2004/025/Q116	m	Hallertauer Gold	WH18/97/003	res.	1
2004/025/R004	m	Opal	WH18/97/003	res.	1
2004/025/R130	m	Opal	WH18/97/003	res.	1
2004/025/R134	m	Opal	WH18/97/003	res.	1
2002/025/093	f	WH18/97/004	87/024/017	res.	1
2002/026/056	f	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2004/021/013	f	WH18/97/006	87/024/027	res.	1
2002/026/768	f	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2002/026/790	f	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2002/026/832	f	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2002/026/853	f	WH18/97/006	97/040/727	res.	1
2002/027/077	f	WH18/97/008	96/008/001	res.	1
2004/024/031	f	Buket	WH18/97/003	res.	1
2004/025/009	f	Hallertauer Gold	WH18/97/003	res.	1
2004/026/022	f	Opal	WH18/97/007	res.	1
2004/026/037	f	Opal	WH18/97/007	res.	1
2004/029/009	f	Herkules	WH18/97/003	res.	1
2004/029/021	f	Herkules	WH18/97/003	res.	1
2004/029/027	f	Herkules	WH18/97/003	res.	1
2004/029/032	f	Herkules	WH18/97/003	res.	1
2004/029/047	f	Herkules	WH18/97/003	res.	1
2004/029/064	f	Herkules	WH18/97/003	res.	1

3.4 AFLP-Analyse und genetische Kartierung der Hallertauer Gold x WH18/97/003 Population

3.4.1 Genetische Kartierung

Die genomische Markeranalyse der Population Hallertauer Gold x WH18/97/003 umfasste AFLP-Marker des Enzymsystems *EcoRI/MseI* und *PstI/MseI* sowie SSR-Marker. Die Population wurde mit 41 AFLP-Primerkombinationen des Enzymsystems *EcoRI/MseI* und zehn AFLP-Primerkombinationen des Enzymsystems *PstI/MseI* gescreent. Hierbei konnten 304 genomische AFLP-Marker detektiert werden. Durchschnittlich waren dies sechs Polymorphismen pro Primerkombination, wobei die Spanne zwischen einem und 21 ausgewerteten Markern lag (Tab. 20). Die Marker-Fragmente waren zwischen 110-572 bp groß. Von den 59 verfügbaren Mikrosatelliten waren 42 polymorph (Polymorphiegrad von 71 %). Es konnten aber nur 27 Marker codominant ausgewertet werden, die übrigen Mikrosatelliten-Marker zeigten kein klar definiertes Bandenmuster.

Tabelle 20: Polymorphiegrad in den Kartierungspopulationen.

Kreuzung	Primerkombinationen	AFLP-Marker gesamt	Polymorphe Banden/Primer-kombination	Polymorphe Banden/Primer-kombination Mittelwert	Geschlechtsmarker
Hallertauer Gold x WH18/97/003	41	304	1-21	6	33
WH18/97/006 x 87/024/027	28	121	1-9	4,5	24
WH18/97/008 x 92/076/721	27	175	1-12	6,5	23
Wye Target x WH18/97/003	28	160	1-11	5,7	2

Nach Erstellung einer Datenmatrix der polymorphen Marker konnte mit Hilfe des Computerprogrammes JoinMap® 3.0 die Kopplungsanalyse durchgeführt werden. Für die Anordnung der Marker in den Kopplungsgruppen wurde ein LOD-Wert von 4.0 gewählt. Die genetische Karte wurde unter dem Einsatz der Kosambi-Funktion mit folgenden Parametern konstruiert: REC (Grenzwert der Rekombination) = 0.45, ripple = 1, jump = 5.00. Im ersten Schritt wurden alle 331 Marker (304 AFLP, 27 SSR) ausgewählt, die in den

Kopplungsgruppen 1 bis 9 zugeordnet wurden. In einem zweiten Schritt wurden zwei Datensätze gebildet. Der eine Datensatz enthielt alle männlichen Marker (Typ II) und darüber hinaus die Marker, die sowohl bei der Mutter als auch beim Vater zu finden sind (Typ III) und alle codominant ausgewerteten SSR-Marker. Der zweite Datensatz beinhaltete alle weiblichen Marker (Typ I) zusammen mit den Markern des Typ III und alle codominant ausgewerteten SSR-Marker. Die zwei Datensätze wurden getrennt verrechnet, was zu männlichen und weiblichen Kopplungsgruppen führte. 31 Marker lagen ungekoppelt vor oder clusterten in kleinen Gruppen. Die Bezeichnung der Kopplungsgruppen erfolgte nach dem chronologischen Auftreten während der Kopplungsanalyse.

Es entstand zum einen eine weibliche (w) Karte, die sich aus sieben Kopplungsgruppen mit 118 Markern zusammensetzte und 125,8 cM des mütterlichen Hopfengenoms abdeckte (Abb. 16). Der durchschnittliche Markerabstand betrug 1,07 cM. Zum anderen konnte eine männliche (m) Karte mit neun Kopplungsgruppen erstellt werden, die das männliche Genom repräsentierte. Diese bestand aus 182 Markern und deckte 319,9 cM des väterlichen Genoms ab (Abb. 16). Der Abstand zwischen den Markern lag durchschnittlich bei 1,76 cM.

Insgesamt konnten 445,7 cM des Hopfengenoms mit 300 molekularen Markern erfasst werden. Die Verteilung der Marker über die Kopplungsgruppen war sehr ungleichmäßig. Die Anzahl der Loci in den Gruppen variierte von 3 (KG 9-m) bis 93 (KG 1-m). Die Länge der einzelnen Kopplungsgruppen lag zwischen 2,2 cM (KG 9-m) und 81,6 cM (KG 5-m). Eine gestörte Spaltung der kartierten Marker konnte vor allem auf der Kopplungsgruppe 1-m festgestellt werden. Dieser Gruppe KG 1-m waren der männliche Phänotyp und alle männlich spezifischen Marker (Geschlechtmarker) zugeordnet (siehe Kapitel 3.4.2, Tab. 21). Diese Kopplungsgruppe repräsentiert vermutlich das Y-Chromosom. Die Markerdichte variierte zwischen 0,24 cM (KG 4-w) und 7,45 cM (KG 8-m).

Das Resistenzgen R_{WH18} befand sich nach der Kopplungsanalyse auf einer eigenen Kopplungsgruppe (KG 9-m). Die AFLP-Marker PxxMxx_292 und PxxMxx_290 lagen 2,2 cM vom R_{WH18} -Locus entfernt.

Die Kopplungsgruppen KG 1-w/m, KG 2-w/m, KG 3-w/m, KG-4w/m, KG6-w/m und KG-7w/m erscheinen als homologe Kopplungsgruppen, da sie über sogenannte „Allelbrücken“ (Marker, die sowohl auf der weiblichen, als auch auf der männlichen Kopplungsgruppe lokalisiert sind) miteinander verbunden werden konnten. Insgesamt konnten 34 Allelbrücken detektiert werden, wobei es sich dabei um neun Mikrosatelliten-Marker und 25 AFLP-Marker handelt.

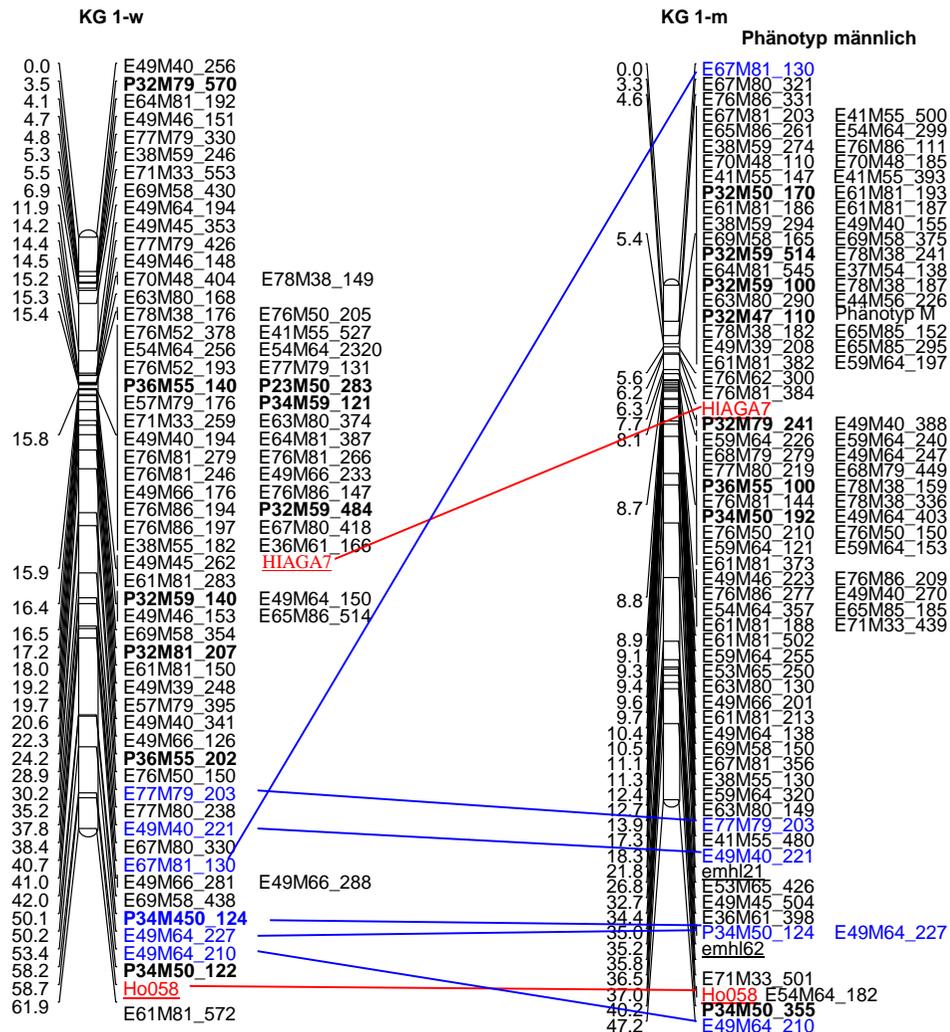
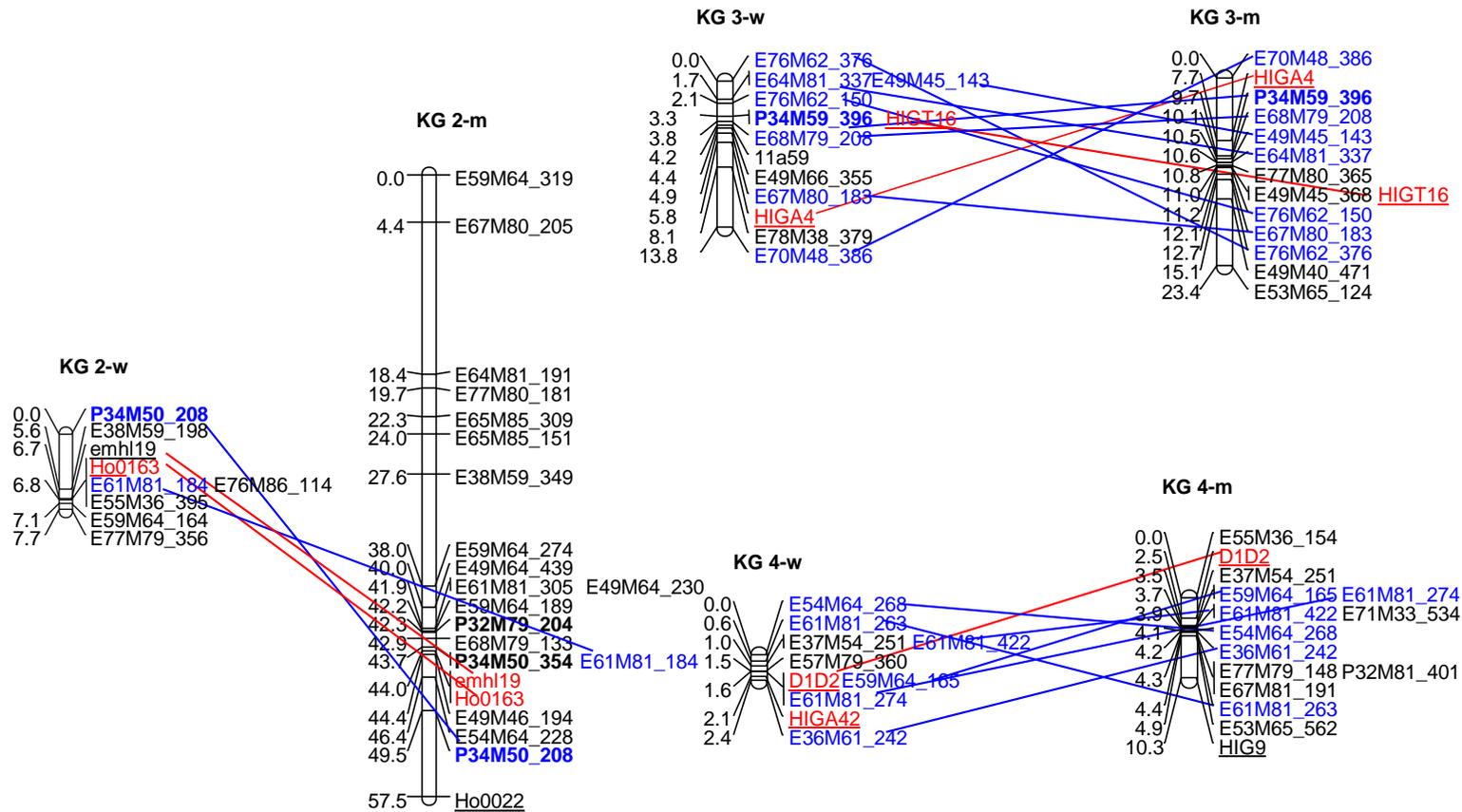


Abbildung 16: Kopplungskarte des Hopfengenoms der Kreuzung Hallertauer Gold x WH18/97/003 nach der getrennten Verrechnung der männlichen und der weiblichen Marker.



Fortsetzung Abbildung 16.

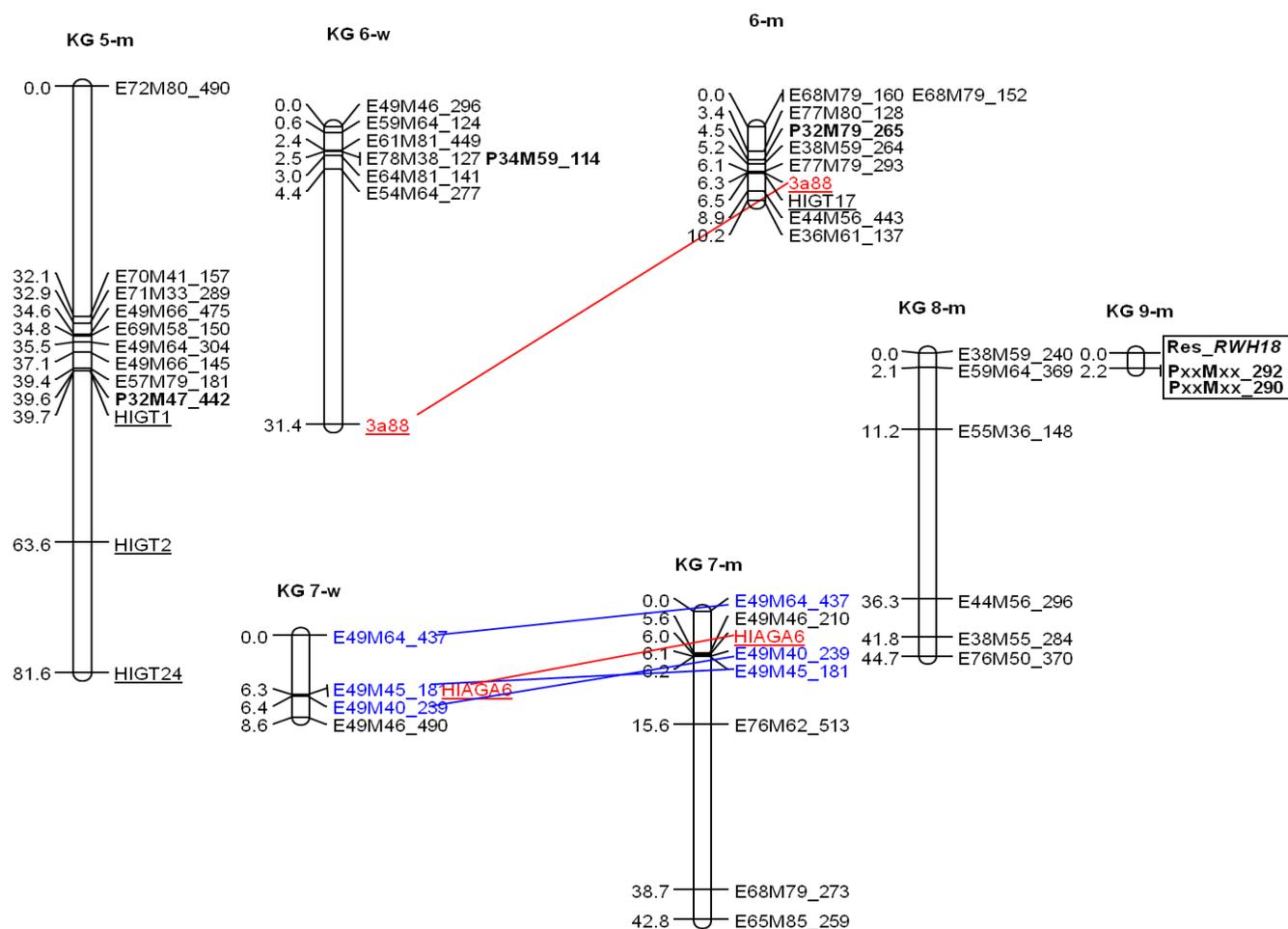


Abbildung 16: Kopplungskarte des Hopfengenoms nach der getrennten Verrechnung der männlichen und der weiblichen Marker. Männliche (1-m bis 9-m) und weibliche (1-w bis 7-w) Kopplungsgruppen des Hopfengenoms basierend auf AFLP und Mikrosatelliten-Marker der Kreuzung Hallertauer Gold x WH18/97/003. **Fett:** AFLP-Marker generiert mit dem Enzymsystem *PstI/MseI*. Unterstrichen: codominant ausgewertete SSR-Marker. Loci, die Allelbrücken zwischen homologen Chromosomen darstellen wurden, wurden miteinander durch einen Strich verbunden. Allelbrücken von AFLP-Markern wurden mit blau, Mikrosatellitenmarkern rot gekennzeichnet. Die Abstände der Marker sind in Centimorgan (cM) angegeben.

3.4.2 Identifizierung molekularer Geschlechtsmarker beim Hopfen in der Kartierungspopulation Hallertauer Gold x WH18/97/003

Aus den 51 AFLP-Primerkombinationen konnten zusätzlich zu den bekannten Geschlechtsmarkern (Polley et al., 1997; Seefelder et al., 2000) 36 weitere männlich spezifische Geschlechtsmarker identifiziert werden. 32 Marker wurden dabei bei den männlichen Pflanzen identifiziert (Tab. 21). Es konnten auch Marker detektiert werden, die bei allen weiblichen und bei 50 % der männlichen Individuen auftraten. Diese Marker könnten mit dem X-Chromosom gekoppelt sein. Für die Fragmentlängenbestimmung wurden die AFLP- und Mikrosatelliten-Produkte der Population und der Eltern gegen einen definierten Größenstandard aufgetragen und über Cross Checker errechnet.

Tabelle 21: Segregation der männlichen AFLP-Geschlechtsmarker in der Hallertauer Gold x WH18/97/003 Kartierungspopulation.

Locus	Segregationstyp	erwartete Segregation	beobachtete Segregation	χ^2	Signifikanz
E41M55_147	<nnxnp>	1:1	111:28 ^{*)}	49,6	*****
E41M55_393	<nnxnp>	1:1	111:28 ^{*)}	49,6	*****
E41M55_500	<nnxnp>	1:1	110:28 ^{**)}	48,7	*****
E44M56_226	<nnxnp>	1:1	112:28	50,4	*****
E54M64_299	<nnxnp>	1:1	108:28 ^{****)}	47,1	*****
E59M64_197	<nnxnp>	1:1	111:28 ^{*)}	49,6	*****
E61M81_186	<nnxnp>	1:1	109:28 ^{****)}	47,9	*****
E61M81_187	<nnxnp>	1:1	109:28 ^{****)}	47,9	*****
E61M81_193	<nnxnp>	1:1	109:28 ^{****)}	47,9	*****
E61M81_382	<nnxnp>	1:1	108:28 ^{****)}	47,1	*****
E65M85_152	<nnxnp>	1:1	112:28	50,4	*****
E65M85_295	<nnxnp>	1:1	112:28	50,4	*****
E65M86_261	<nnxnp>	1:1	110:28 ^{**)}	48,7	*****
E78M38_182	<nnxnp>	1:1	112:28	50,4	*****
E78M38_187	<nnxnp>	1:1	112:28	50,4	*****
E78M38_241	<nnxnp>	1:1	112:28	50,4	*****
E69M58_165	<nnxnp>	1:1	111:27 ^{**)}	51,1	*****
E69M58_375	<nnxnp>	1:1	111:27 ^{**)}	51,1	*****
E70M48_110	<nnxnp>	1:1	111:28 ^{*)}	49,6	*****
E70M48_185	<nnxnp>	1:1	111:28 ^{*)}	49,6	*****
E76M62_300	<nnxnp>	1:1	110:28 ^{**)}	48,7	*****
E63M80_290	<nnxnp>	1:1	112:28	50,4	*****
E64M81_545	<nnxnp>	1:1	112:28	50,4	*****
E67M81_203	<nnxnp>	1:1	112:27 ^{*)}	52,0	*****
E76M81_384	<nnxnp>	1:1	111:29	48,0	*****
E76M86_111	<nnxnp>	1:1	111:28 ^{*)}	49,6	*****
E76M86_331	<nnxnp>	1:1	112:26 ^{**)}	53,6	*****
E67M80_321	<nnxnp>	1:1	111:24 ^{****)}	56,1	*****

E49M40_155	<nnxnp>	1:1	112:27*)	52,0	*****
E37M54_138	<nnxnp>	1:1	112:28	50,4	*****
P32M50_170	<nnxnp>	1:1	111:28	49,6	*****
P32M59_514	<nnxnp>	1:1	112:28	50,4	*****
P32M59_100	<nnxnp>	1:1	112:28	50,4	*****
P32M47_110	<nnxnp>	1:1	112:28	50,4	*****
E49M39_208	<nnxnp>	1:1	112:28	50,4	*****
E38M59_294	<nnxnp>	1:1	110:28**)	48,7	*****

*) ein Ausfall, **) zwei Ausfälle, ***) drei Ausfälle, ****) vier Ausfälle, *****) fünf Ausfälle.

Alle Marker zeigten eine vollständige Übereinstimmung in ihrem Spaltungsverhalten. Auch der von Jakse et al. (2008b) beschriebene Mikrosatellitenmarker HIAGA7 konnte identifiziert werden (Abb. 17). Der Marker generierte wie bei Jakse et al. (2008b) vier Allele und ist dem Segregationstyp *ab x cd* zuzuordnen. Die erwartete Spaltung von 1:1:1:1 wurde mit dem χ^2 -Test geprüft und zeigte eine starke Abweichung von dem zu erwartenden Spaltungsverhältnis (Tab. 22). Die Bande, die nur bei den männlichen Pflanzen auftrat, hatte eine Größe von 166 bp und hatte damit annähernd die Größe von 165 bp, wie sie bei Jakse et al. (2008b) beschrieben wurde.

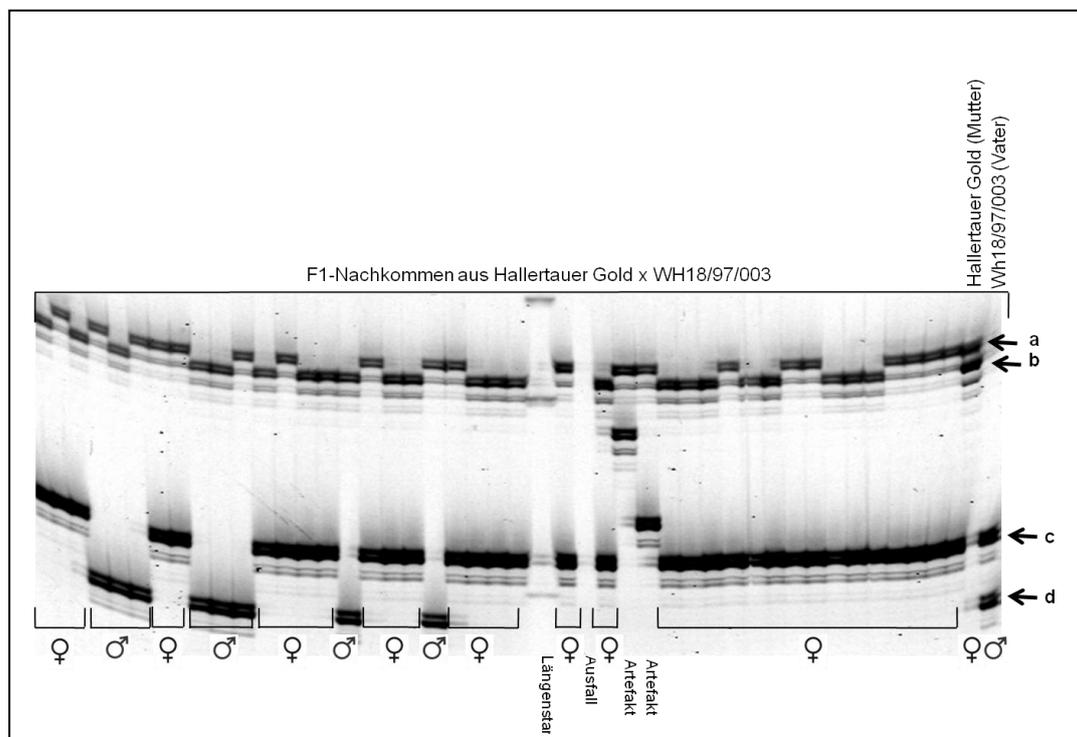


Abbildung 17: Männlich spezifischer Geschlechtsmarker in der Population Hallertauer Gold x WH18/97/003. Ausschnitt aus einem PAA-Gel des Mikrosatelliten HIAGA7. Das Fragment mit der Bezeichnung „d“ stellt die 166 bp große männlich spezifische Bande dar.

Tabelle 22: Segregation von HIAGA7 in der Hallertauer Gold x WH18/97/003 Kartierungspopulation.

Locus	Segregationstyp	erwartete Segregation ac: ad:bc:bd	beobachtete Segregation ac: ad:bc:bd	χ^2	Signifikanz
HIAGA7	<abxcd>	1:1:1:1	56:14:52:13	48,9	*****

Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Pflanzen lag in der Kartierungspopulation Hallertauer Gold x WH18/97/003 bei 28 : 112 (Tab. 23). Dieses gestörte Spaltungsverhältnis von männlichen zu weiblichen Pflanzen wurde beim Hopfen schon in früheren Arbeiten festgestellt (Haunold, 1991; Neve, 1991; Seefelder et al., 2000; Patzak et al., 2002; Cerenak et al., 2006; Jakse et al., 2008b).

Tabelle 23: Verhältnis weiblicher zu männlichen Pflanzen in den Kartierungspopulationen. Das Geschlecht wurde mit Hilfe von AFLP-Markern festgestellt.

Kartierungspopulation	weibliche Pflanzen	männliche Pflanzen	Verhältnis
Hall. Gold x WH18/97/003	112	28	4:1
WH18/97/006 x 87/024/027	123	17	7,2:1
87/024/056 x WH18/97/007	104	36	2,9:1
Opal x WH18/97/003	136	4	34:1
WH18/97/008 x 92/076/721	109	22	5:1
Wye Target x WH18/97/003	135	5	27:1

3.5 AFLP-Analyse und genetische Kartierung der Wye Target x WH18/97/003 Population

Die AFLP-Analyse und genetische Kartierung der Population mit zwei Resistenzträgern (Wye Target x WH18/97/003) wurde nach dem gleichen Prinzip wie in Kapitel 3.4 beschrieben durchgeführt.

Die Population Wye Target x WH18/97/003 wurde mit 28 AFLP-Primerkombinationen des Enzymsystems *EcoRI/MseI* und zwei AFLP-Primerkombinationen des Enzymsystems *PstI/MseI* gescreent. Dabei konnten 160 genomische AFLP-Marker detektiert werden, was einen Durchschnitt von 5,7 Polymorphismen pro Primerkombination entsprach (Tab. 20). Die Fragmente waren zwischen 100-491 bp groß. 43 der 59 verfügbaren Mikrosatelliten waren polymorph (Polymorphiegrad von 73 %). Von diesen konnten 21 Marker codominant ausgewertet werden, die übrigen Mikrosatelliten-Marker wurden dominant ausgewertet.

Bis auf den LOD-Wert wurden die gleichen Parameter für die Erstellung der genetischen Karte gewählt wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben. Die Verrechnung von 238 Marker der Kreuzung Wye Target x WH18/97/003 bei einem LOD-Wert von 3.0 resultierte in einer gemeinsamen Kopplungskarte mit neun Kopplungsgruppen und deckte 240,9 cM des Hopfengenoms ab.

Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Pflanzen lag in der Kartierungspopulation Wye Target x WH18/97/003 bei 5 : 135 (Tab. 23).

Nach der getrennten Verrechnung der männlichen und weiblichen Marker entstanden zwei Karten. Die weibliche (w) Karte, die sich aus sechs Kopplungsgruppen mit 146 Markern zusammensetzte, deckte 226 cM des mütterlichen Hopfengenoms ab (Abb. 20). Der durchschnittliche Markerabstand betrug 1,5 cM. Zum anderen konnte eine Karte mit sechs Kopplungsgruppen erstellt werden, die das Genom von WH18/97/003 repräsentierte. Diese bestand aus 50 Markern und deckte 125,5 cM des männlichen (m) Genoms ab (Abb. 20). Der durchschnittliche Abstand zwischen den Markern lag dabei bei 2,5 cM.

Insgesamt konnten 351,5 cM des Hopfengenoms mit 196 molekularen Markern erfasst werden. 42 Marker lagen ungekoppelt vor oder clusterten in kleinen Gruppen, die keinem Chromosom zugeordnet werden konnten. Die Verteilung der Marker über die Kopplungsgruppen variierte sehr stark und reichte von 3 (KG 6-m) bis 50 (KG 1-w). Die Länge der einzelnen Kopplungsgruppen variierte zwischen 2,2 cM (KG 6-m) und 68,7 cM (KG 1-w). Die Markerdichte lag zwischen 0,55 (KG 3-m) und 7,5 (KG 6-w).

Das Resistenzgen R_2 aus Wye Target wurde auf der Kopplungsgruppe 3-w kartiert (Abb. 18). Der AFLP-Marker PxxMxx_201 ist der am engsten gekoppelte Marker und befindet sich direkt am Resistenzlocus. Weitere eng gekoppelte Marker konnten im Abstand von 0,2 cM (ExxMxx_108) und 0,4 cM (ExxMxx_161, ExxMxx_185, ExxMxx_195, ExxMxx_168, ExxMxx_159) identifiziert werden. Im Abstand von 0,4 cM vom R_2 -Resistenzlocus konnten ebenso zwei SSR-Marker HIGxx und HIGxx kartiert werden, die allerdings als dominante Marker ausgewertet wurden.

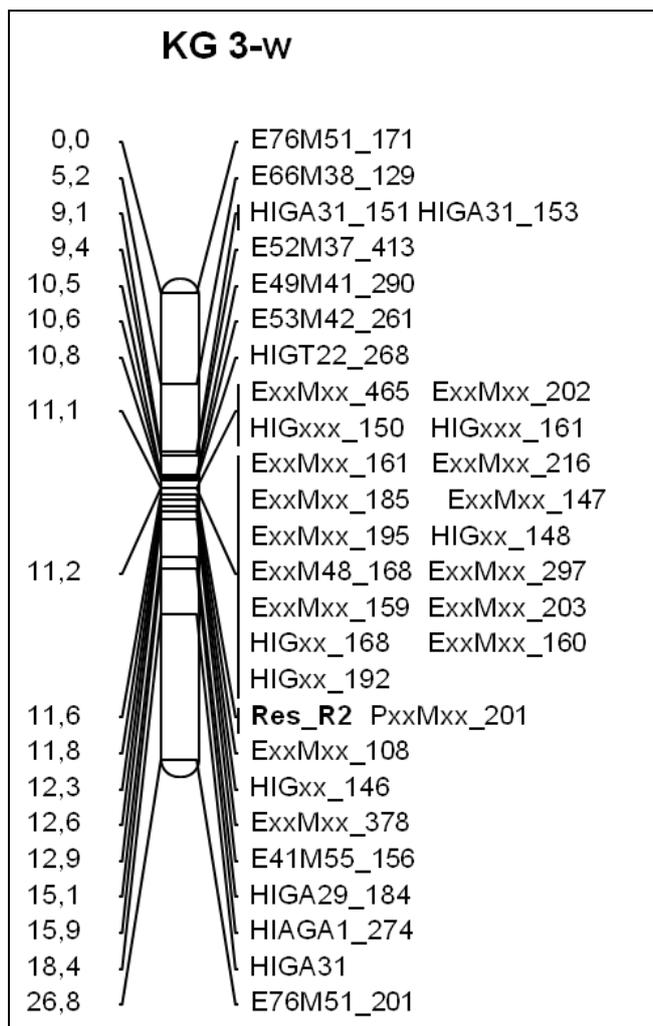


Abbildung 18: Resistenzlocus R_2 auf der Kopplungsgruppe KG 3-w der Kartierungspopulation Wye Target x WH18/97/003. **Fett:** Resistenzlocus R_2 .

Bei der Erstellung einer gemeinsamen Kopplungskarte, d.h. der gemeinsamen Verrechnung der weiblichen und der männlichen Marker, kartierte der männliche Phänotyp auf der KG 2 (Abb. 19).

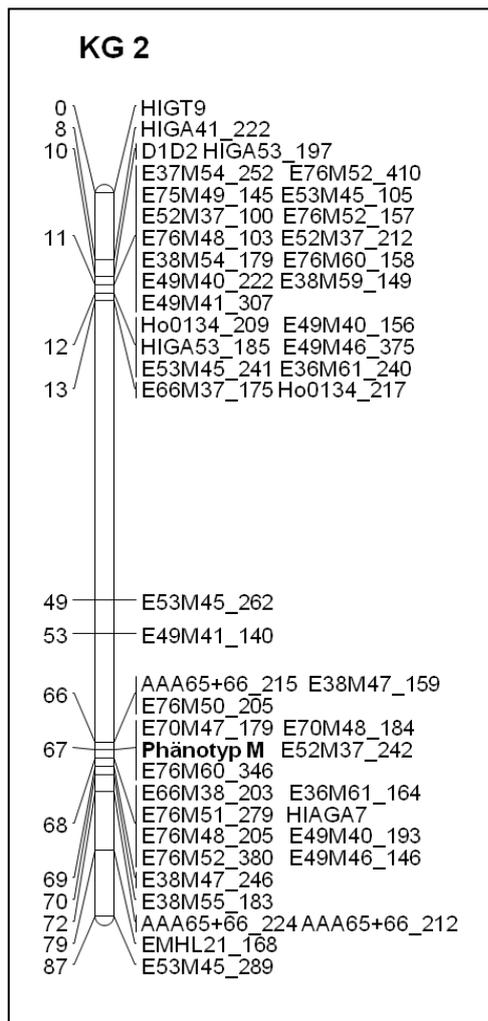


Abbildung 19: Kopplungsgruppe KG 2 der gemeinsamen Kopplungskarte (männlich und weiblich) der Kreuzung Wye Target x WH18/97/003 nach der Verrechnung aller Marker bei einem LOD-Wert von 3.0. **Fett:** Phänotyp männlich.

Das Resistenzgen R_{WH18} kartierte ebenso wie bei der Kopplungsanalyse der Population Hallertauer Gold x WH187977003 auf einer eigenen Kopplungsgruppe (KG 6-m) (Abb. 20).

Innerhalb der Kopplungsgruppen KG 1-w/m, KG-4w/m und KG-5w/m konnten die homologen Paare über „Allelbrücken“ verbunden werden (Abb. 20). Auf der Kopplungsgruppe 1 verknüpften drei AFLP- und ein SSR-Marker die weibliche und die männliche Kopplungsgruppe. Die Gruppe KG 4 konnte durch einen und die Gruppe KG 5 durch fünf Mikrosatelliten-Marker verbunden werden.

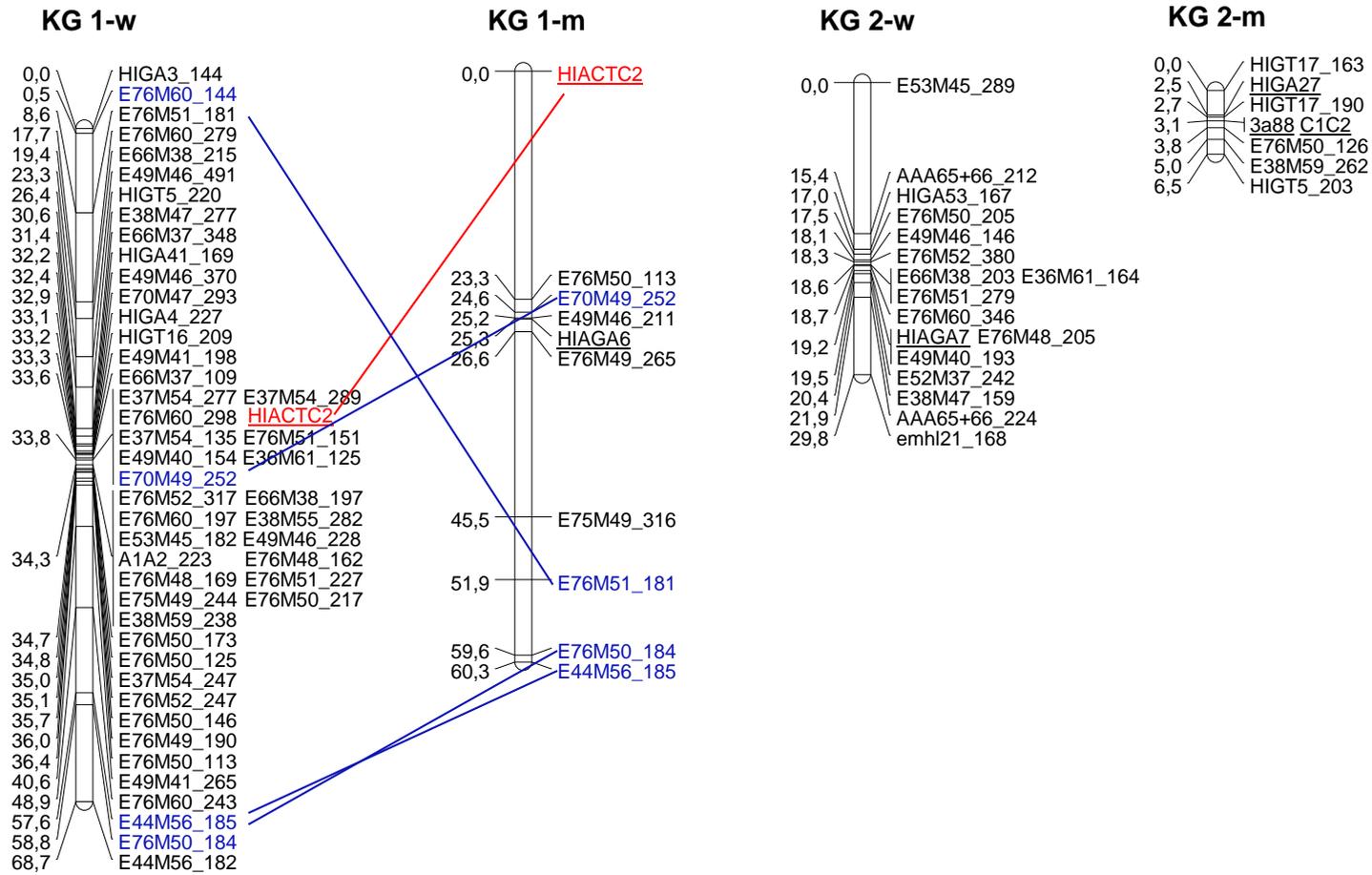
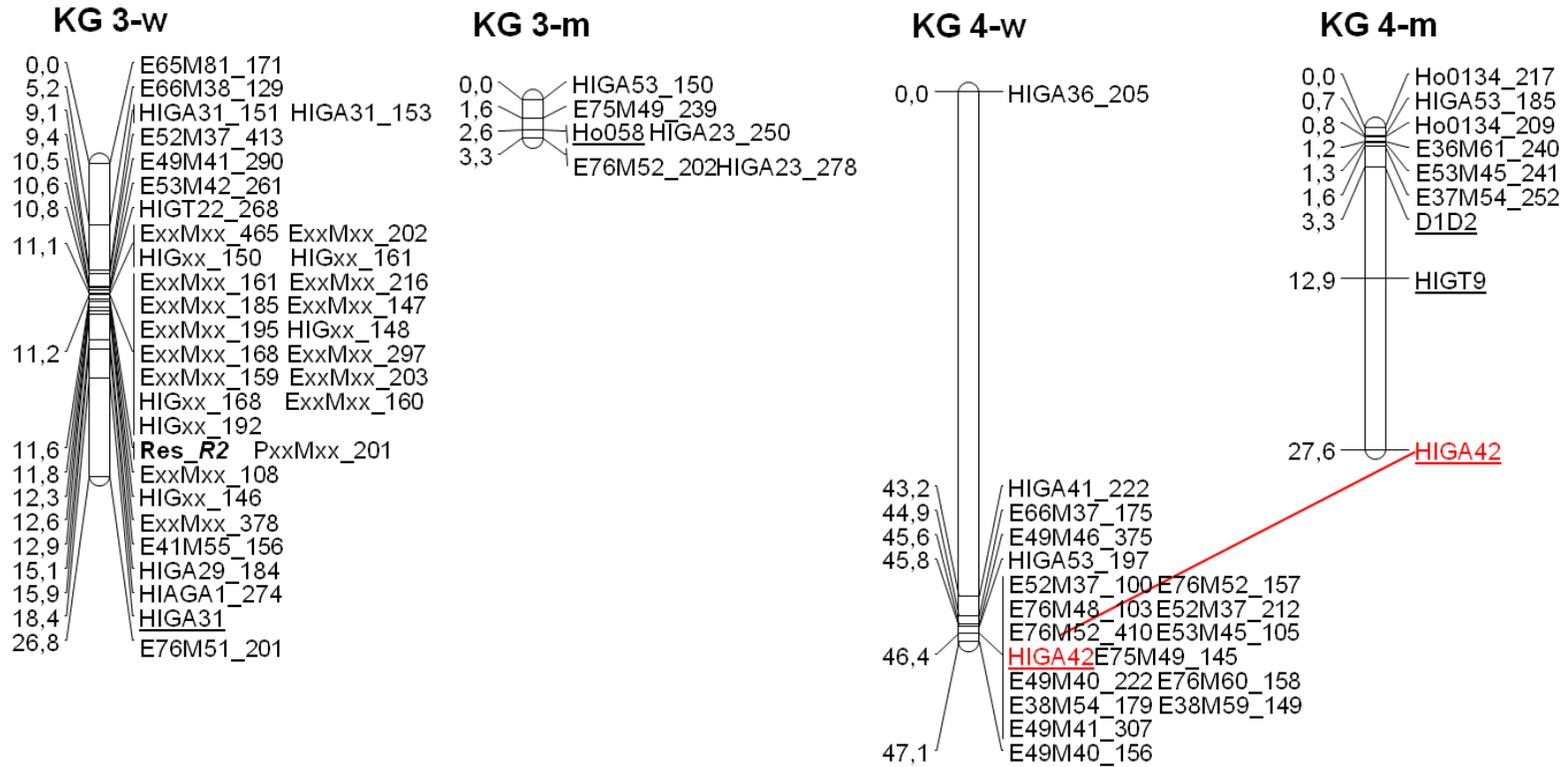


Abbildung 20: Kopplungskarte des Hopfengenoms der Kreuzung Wye Target x WH18/97/003 nach der getrennten Verrechnung der männlichen und der weiblichen Marker.



Fortsetzung **Abbildung 20.**

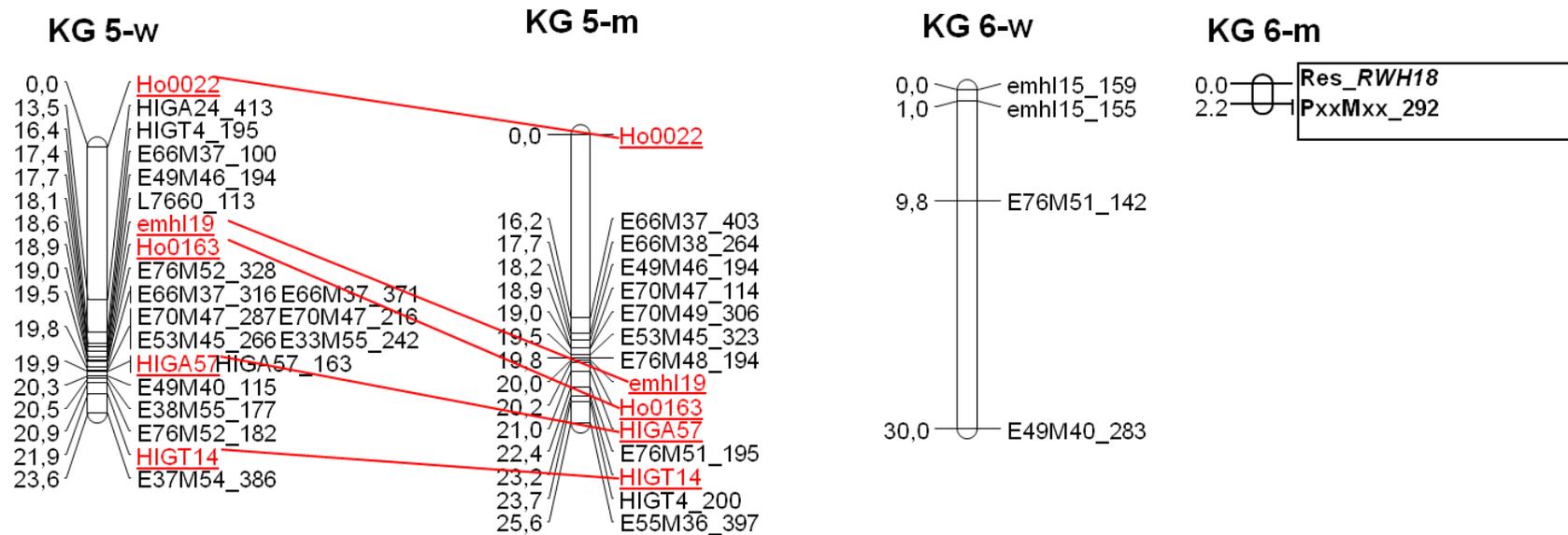


Abbildung 20: Kopplungskarte des Hopfengenoms nach der getrennten Verrechnung der männlichen und der weiblichen Marker. Männliche (1-m bis 9-m) und weibliche (1-w bis 8-w) Kopplungsgruppen des Hopfengenoms basierend auf AFLP und Mikrosatelliten-Marker der Kreuzung Wye Target x WH18/97/003. **Fett:** AFLP-Marker generiert mit dem Enzymsystem *PstI/MseI*. Unterstrichen: codominant ausgewertete SSR-Marker. Loci, die Allelbrücken zwischen homologen Chromosomen darstellen wurden, wurden miteinander durch einen Strich verbunden. Allelbrücken von AFLP-Markern wurden mit blau, Mikrosatellitenmarkern rot gekennzeichnet. Die Abstände der Marker sind in Centimorgan (cM) angegeben. Res_R2 auf KG 3-w stellt den Resistenzlocus für das R_2 -Gen und Res_RWH18 auf KG 6-m den Resistenzlocus für R_{WH18} dar.

In der Kartierungspopulation Wye Target x WH18/97/003 wurden auf einzelnen Kopplungsgruppen Markercluster sowohl im Centromer- als auch im Telomerbereich der Kopplungsgruppen beobachtet (Abb. 21).

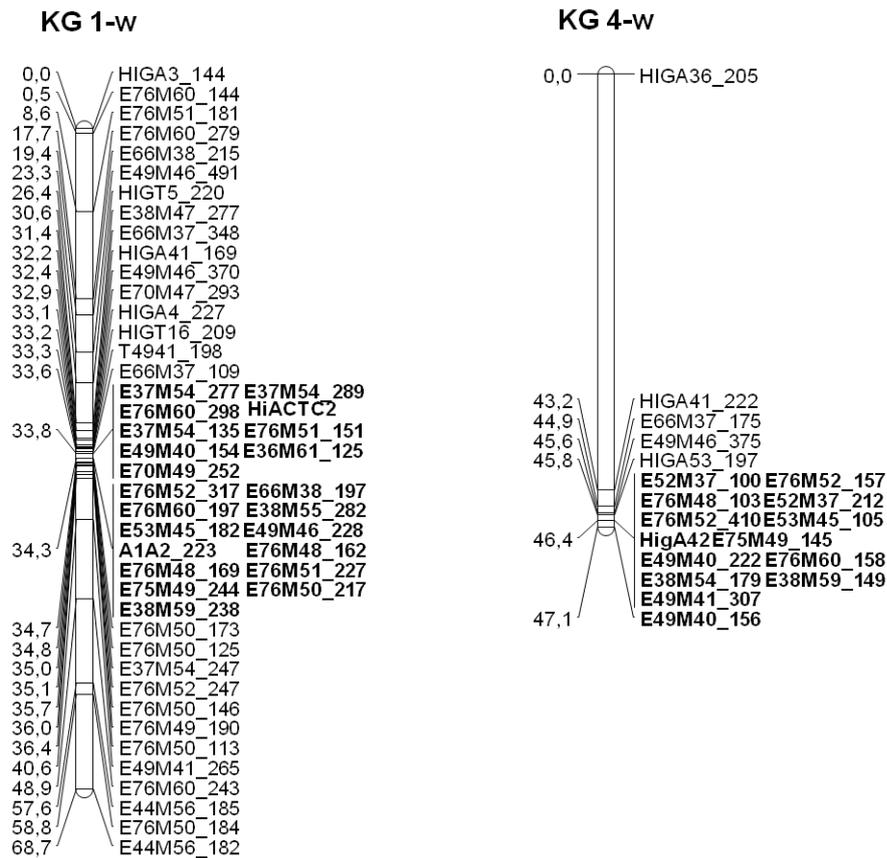


Abbildung 21: Clusterbildung am Centromerbereich (links) bzw. Telomerbereich (rechts) der Kopplungsgruppe KG 1-w bzw. KG 4-w der Kartierungspopulation Wye Target x WH18/97/003. **Fett:** Marker innerhalb des Clusters.

3.6 Differentielle Banden über cDNA-AFLPs

3.6.1 Erster Versuch: Inokulation von *in vitro*- Pflanzen der Kreuzung Opal x WH18/97/003 (T1, T2, T4 und T9)

Zur Darstellung differentieller Genexpression bei Hopfen nach Kontakt mit dem Echten Mehltau in Abhängigkeit vom Resistenzgen R_{WH18} wurden von zwei mit dem Blattresistenzprüfsystems als resistent (T1 und T4) und zwei als anfällig (T2 und T9) eingestuften Hopfengenotypen der Kreuzung Opal x WH18/97/003 Blätter mit Pilzsporen inokuliert (Hu9; $\nu 3$, νB Virulentyp). Bei dem Isolat Hu9 handelte es sich um ein avirulentes

Isolat. Zu dem damaligen Zeitpunkt stand kein virulentes Isolat für die WH18-Resistenz zur Verfügung. Dazu wurden *in vitro*-angezogene Pflanzen genommen, weil bei ihnen sichergestellt werden konnte, dass sie vorher noch keinen Kontakt mit Mehltausporen hatten und daher auch keine Genaktivitäten, die durch den Kontakt mit dem Mehltaupilz ausgelöst worden wären, zeigen würden.

4 bzw. 6, 24 und 168 Stunden nach Inokulation wurden die Blätter der *in vitro*-Pflanzen geerntet, die RNA daraus isoliert und ein cDNA-AFLP Screening mit 73 Primerkombinationen des Enzymsystems *EcoRI/MseI* und 20 Primerkombinationen des Enzymsystems *Pst/MseI* durchgeführt. Eine nicht-inokulierte Kontrolle wurde nur zum Zeitpunkt null genommen. 93 *EcoRI/MseI* AFLP-Primerkombinationen produzierten 20 bis 60 TDFs pro Primerkombination mit einer Größe zwischen 75 und 700 bp. Insgesamt konnten somit etwa 3.720 TDFs generiert werden. Durch diesen Versuchsansatz ließen sich verschiedene exprimierte Fragmente darstellen. Einige Fragmente waren konstitutiv nur in bestimmten Genotypen exprimiert. So konnten auch Fragmente detektiert werden, die nur in den zwei resistenten Genotypen zu finden waren, nicht aber in den beiden anfälligen Genotypen (Abb. 22). Etwa 15 % aller TDFs wurden nach Inokulation mit dem Echten Mehltau differentiell exprimiert. Diese Fragmente von Genen scheinen durch das Pathogen induziert worden zu sein. Dabei gab es Fragmente, die schon zu einem frühen Zeitpunkt nach der Inokulation exprimiert wurden, andere wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt aktiviert (Abb. 22).

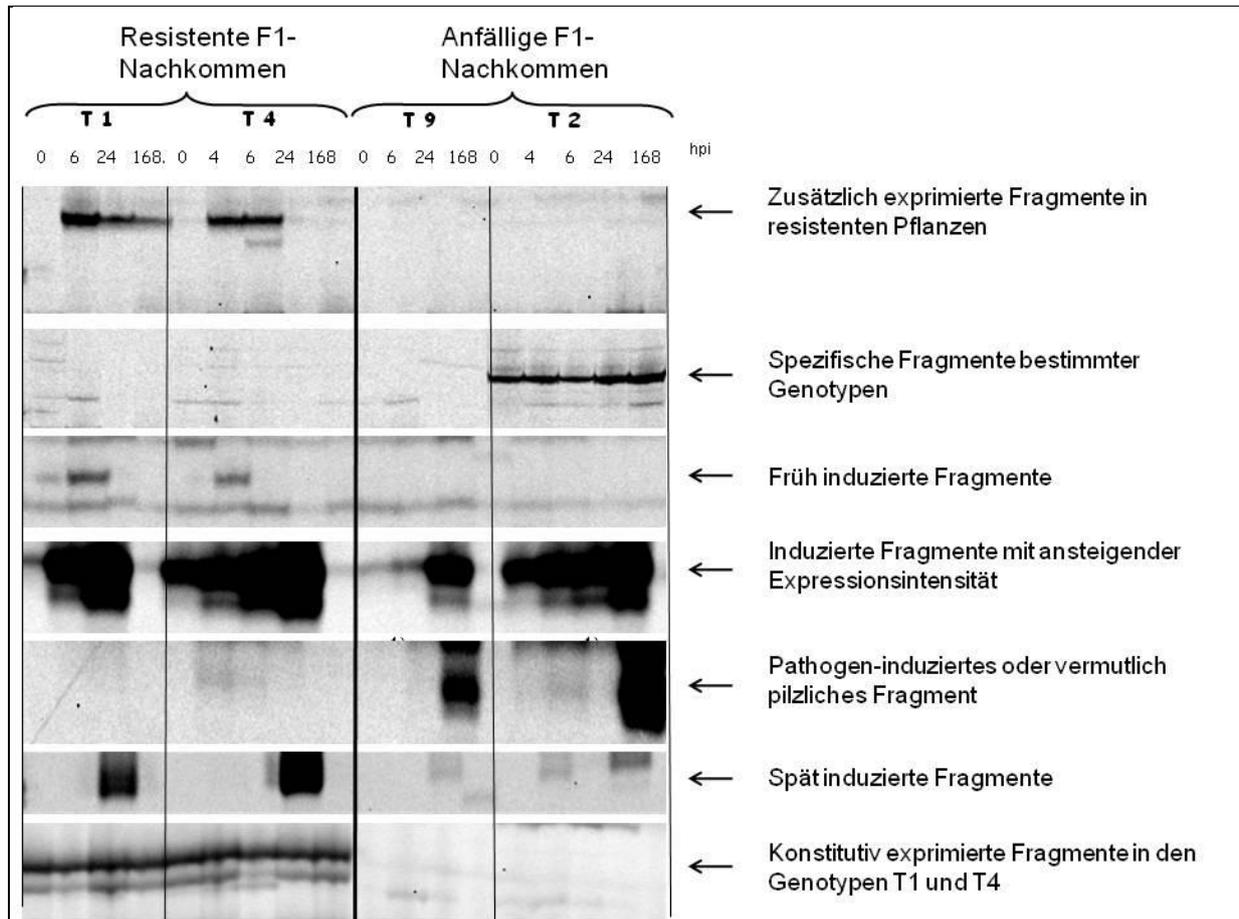


Abbildung 22: Auftragsschema und beispielhaftes Bandenmuster einer cDNA-AFLP-Analyse bei Hopfen. Zum Zeitpunkt 0 waren die Pflanzen noch nicht inokuliert, gefolgt von drei inokulierten Proben zu den Zeitpunkten 4 bzw. 6, 24 und 168 hpi. T1: *R_{WH18}*-tragend, T4: *R_{WH18}*-tragend, T9: ohne *R_{WH18}*, T2: ohne *R_{WH18}*. hpi: Stunden post Inokulation.

Der größte Teil dieser TDFs zeigte sowohl sechs als auch 24 Stunden nach Inokulation eine erhöhte Expression in den resistenten Genotypen. Insgesamt wurden bei den resistenten Hopfen mehr Gene angeschaltet bzw. hochreguliert (7 % angeschaltet oder hochreguliert und 2 % ausgeschaltet bzw. herunter reguliert) als in anfälligen Hopfen (4 % und 1 %). Sieben Tage nach Inokulation waren die meisten Transkripte und damit ihre exprimierten Gene wieder herunter reguliert. Einige Genfragmente stammten vermutlich aus pilzlicher DNA.

3.6.2 Zweiter Versuch: Inokulation von im Gewächshaus angezogenen Wildhopfen WH18/97/003 und WH18/97/006

Die *in vitro*-Hopfenpflanzen bereiteten zum einen einige Schwierigkeiten bei der Vermehrung, zum anderen waren sie in sich relativ heterogen, obwohl es sich bei den Pflanzen um Klone handelte. Aus diesem Grund wurden in einem zweiten Versuchsansatz die Hopfenblätter der im Gewächshaus angezogenen mehltreueren Genotypen WH18/97/003 und WH18/97/009

mit Sporen des Echten Mehltaus (Bu10; $v3$, $v4$, $v6$, vB Virulenz-Typ) inokuliert. Bei dem Isolat Bu10 handelte es wie bei dem Isolat Hu9 (siehe 3.6.1) um ein avirulentes Isolat. Bei der Anzucht der Pflanzen wurde streng darauf geachtet, dass im Gewächshaus keinerlei Mehltaubefall auftrat. Anders als beim ersten Versuchsansatz wurden nur resistente und keine anfälligen Pflanzen mit Mehltau inokuliert. Ein weiterer Unterschied im Vergleich zum ersten Versuch bestand darin, dass bei diesem Versuchsansatz unbehandelte Kontrollpflanzen zur Verfügung standen, die zu jedem Erntezeitpunkt geerntet wurden. 0, 4, 8, 24, 48 und 168 h nach Inokulation wurden die Blätter geerntet, RNA isoliert und eine cDNA-AFLP-Analyse mit 67 Primerkombinationen des Enzymsystems *EcoRI/MseI* durchgeführt. Dabei wurden 20 bis 60 TDFs pro Primerkombination mit einer Größe zwischen 75 und 700 bp detektiert, so dass insgesamt ca. 2.680 Banden generiert werden konnten. Auch in diesem zweiten Versuchsansatz konnten mehr Transkripte und damit ihre exprimierten Gene beobachtet werden, die in den resistenten Genotypen hochreguliert (6 % angeschaltet oder hochreguliert; Abb. 23 a) als herunter reguliert (3 % ausgeschaltet bzw. herunter reguliert; Abb. 23 b) wurden, im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle. Die Expressionsmuster der beiden beimpften Wildhopfen unterschieden sich dabei teilweise in ihrer Ausprägung.

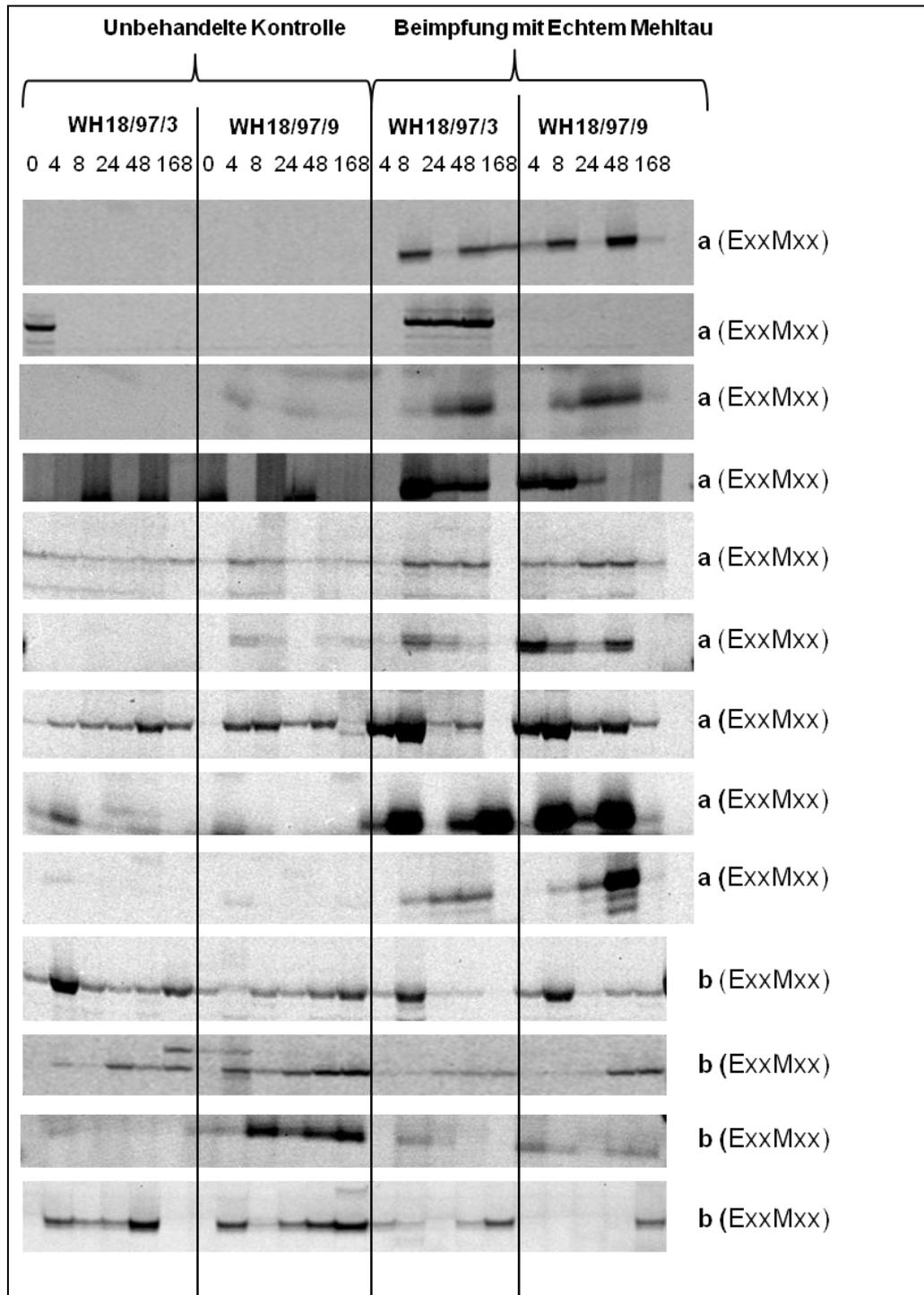


Abbildung 23 : Beispiele für verschiedene Expressionsmuster von TDFs in AFLPs von WH18/97/003 und WH18/97/009 nach Inokulation mit *Podosphaera macularis* spp. *humuli* (Echter Mehltau) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im Zeitraum von 0 bis 168 Stunden.

Legende: a = Hochregulierung exprimierter Gene in resistenten Genotypen, b = Herunterregulierung exprimierter Gene in resistenten Genotypen.

3.6.3 Resistenzassoziierte Marker

TDFs, die differentiell nach der Inokulation mit Echtem Mehltau zu bestimmten Zeitpunkten bei den resistenten im Vergleich zu den anfälligen Individuen (Versuch 1; Abb. 24) oder differentiell bei den inokulierten WH18-Pflanzen im Gegensatz zu den unbehandelten WH18-Kontrollpflanzen (Versuch 2; Abb. 23) exprimiert wurden, könnten möglicherweise mit der Abwehr gegenüber dem Echten Mehltaupilz assoziiert assoziiert sein.

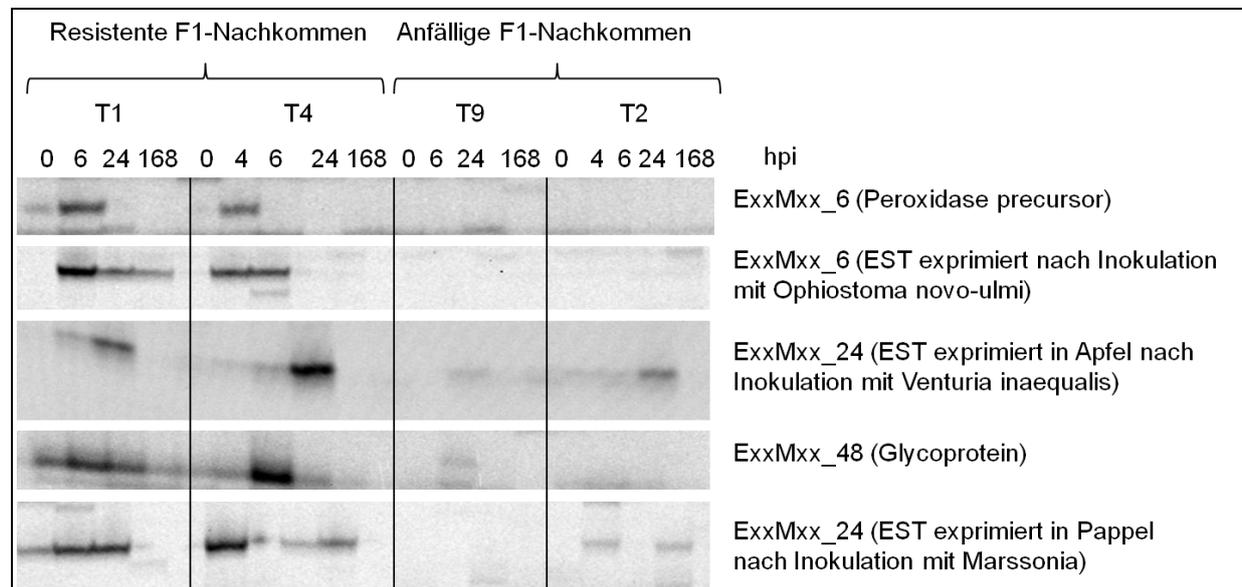


Abbildung 24: Beispiele für möglicherweise resistenzspezifische Genfragmente im cDNA-AFLP. Rechts daneben ist die Primerkombination angegeben, mit der die Polymorphismen dargestellt wurden. Die Zuordnung der TDFs zu den in Klammern geschriebenen ESTs erfolgte nach der BLAST-Analyse. Das Auftragsmuster entspricht dem in Abb. 22.

50 differentielle Banden wurden aus Gelen ausgeschnitten und anschließend von jedem Fragment jeweils zwei Klone sequenziert. Dabei wurde z.T. das auf gleicher Höhe auftretende Fragment in verschiedenen Genotypen ausgeschnitten, um zu sehen, ob es sich auch tatsächlich um das gleiche TDF handelt. Aus diesem Grund ist die Anzahl der TDFs in der Tabelle 24 geringer als die Anzahl der sequenzierten Fragmente. Die Sequenzen der TDFs wurden einer BLAST-Analyse in der Datenbank von NCBI (non-redundant (nr) und EST-Datenbank) unterzogen. Bei allen TDFs wurde der Treffer mit dem kleinsten E-Wert angegeben (Tab. 24).

Tabelle 24: Liste der sequenzierten TDFs mit dem jeweiligen besten BLAST-Ergebnis und dem E-Wert. Dargestellt sind die im resistenten Genotyp T1, T4 und WH18/97/003 und im anfälligen Genotyp T2 nach der Inokulation mit Echten Mehltau differenziell regulierten TDFs. Die Gene der blau unterlegten TDFs wurden 0-6 hpi, der grün unterlegten 6-24 hpi, der orange unterlegten 24-48 hpi und der rot unterlegten TDFs 48-168 hpi differenziell reguliert. Von den mit * gekennzeichneten TDFs konnten genomische Sequenzen gewonnen werden.

TDF	Fragmentname	Genotyp	hpi	Größe	Blast Hit	E-Wert
TDF_003	ExxMxx_6	T4	6	156	<i>Nicotiana sylvestris</i> mRNA, expressed in leaf	4,00E-19
TDF_004	ExxMxx_6	T4	6	160	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA clone, expr. in leaf	8,00E-04
TDF_005	ExxMxx_6	T4	6	117	Wheat salt-stressed root cDNA library	5,00E-10
TDF_007	ExxMxx_6	T4	6	218	EST: <i>Ulmus americana</i> mRNA sequence	8,00E-18
TDF_008	ExxMxx_6	T1	6	190	<i>Humulus lupulus</i> Trichome isolated from female flower	1,00E-60
TDF_009	ExxMxx_6	T4	6	106	<i>Vitis vinifera</i> , whole shotgun sequence	0,017
TDF_015	ExxMxx_6	T9	6	134	<i>Lettuce perennis</i> EST	6,00E-04
TDF_016	ExxMxx_6	T1	6	252	<i>Mus musculus</i>	0,016
TDF_019	ExxMxx_6	T1	6	377	<i>Lycopersicum esculentum</i> mRNA for peroxidase precursor	2,00E-35
TDF_023	ExxMxx_6	T4	6	193	<i>Glycine clandestina</i> , cold stressed	1,00E-09
TDF_026	ExxMxx_6	T2	6	106	Global ocean sampling	0,79
TDF_027	PxxMxx_6	T1	6	156	<i>Tamarix hispida</i> leaves at different stress times	2,2724
TDF_034	PxxMxx_6	T1	6	237	no hit	5,40E-94
TDF_035	ExxMxx_6	T4	6	177	<i>Humulus lupulus</i> Trichome isolated from female flower	5,40E-94
TDF_011	ExxMxx_22	T4	22	235	<i>Phytophthora sojae</i> genes	2,00e ⁻⁵¹ , 79%
TDF_014	ExxMxx_22	T1	22	105	Royal Gala seedling leaves infected with <i>Venturia inaequalis</i>	7,00E-08
TDF_017	ExxMxx_22	T1	22	650	<i>Coccidioides posadasii</i>	5,28E-32
TDF_022	ExxMxx_22	T1	22	106	<i>Vitis vinifera</i> , whole shotgun sequence	0.019
TDF_029	PxxMxx_24	T4	24	183	<i>Humulus lupulus</i> Trichome isolated from female flower	1,46E-97
TDF_030	ExxMxx_24	T1	24	84	Protein	2,00E-12
TDF_032	PxxMxx_24	T4	24	200	<i>Aspergillus nidulans</i>	5,00E-47
TDF_033	PxxMxx_24	T1	24	264	phosphate-responsive 1 familiy protein	8,56E-26
TDF_036	PxxMxx_24	T1	24	624	<i>Ophiostoma clavigerum</i>	3,00E-17
TDF_037	ExxMxx_24	T4	24	205	<i>Populus</i> leaf inoculated with <i>Marssonina</i> pathogen	5,00e ⁻²⁹ , 86%
TDF_038	ExxMxx_24	T4	24	116	potato abiotic stress cDNA library	3,00e ⁻³² , 87%

TDF	Fragmentname	Genotyp	hpi	Größe	Blast Hit	E-Wert
TDF_040	PxxMxx_24	T4	24	170	soyabean infected with <i>Phakopsora pachyrrhizi</i>	2,00E-30
TDF_041	PxxMxx_24	T1	24	449	<i>Humulus lupulus</i> Trichome isolated from female flower	0,007
TDF_042	ExxMxx_24	WH18/97/003	24	267	mitochondrial gene for mitochondrial product	1,00e ⁻¹²⁷ , 98%
TDF_044	ExxMxx_24	WH18/97/003	24	246	<i>Poncirus trifoliata</i> roots with Iron Deficiency	2,00e ⁻²⁵ , 71%
TDF_031	ExxMxx_48	WH18/97/003	48	99	Glycoprotein	7,00E-12
TDF_043	ExxMxx_48	WH18/97/003	48	267	mitochondrial gene for mitochondrial product	1,00e ⁻¹²⁷ , 98%
TDF_021	ExxMxx_7d	T4	7d	418	<i>Gibberella zeae</i> cDNA	6,00E-55
TDF_024	ExxMxx_7d	T2	7d	207	<i>Amorphithecra resinae</i>	2,00E-38

Die Größe der isolierten cDNA-Fragmente variierte zwischen 79 und 650 bp, wobei nur wenige über 300 bp waren (16 %). Rund 60 % der dargestellten Banden waren kleiner als 200 bp.

Ausgehend von ihrer Homologie auf Proteinebene, kann man die identifizierten Fragmente in hypothetische Funktionseinheiten einteilen (Abb. 25). 17 % der cDNA-Fragmente zeigten eine Homologie zu in Trichomen aktiven oder identifizierten ESTs von *Humulus lupulus* L. auf. Es konnten Homologien zu Sequenzen gefunden werden, die in verschiedenen Stresssituationen (14 %) von unterschiedlichen Pflanzen involviert waren oder speziell bei Pilzabwehrreaktionen (9 %) in anderen Wirt/Pathogensystemen detektiert wurden. Auch Homologien zu pilzlichen Sequenzen verschiedener Ascomyceten (7 %) oder anderen Pilzen (5 %) konnten identifiziert werden. Eine Sequenz (TDF 019) zeigte eine Homologie zu einem Precursor einer Peroxidase, die oft in Redox-Regulationen beteiligt ist. 5 % der Sequenzen zeigten eine Homologie zu Proteinen, u. a. eine Sequenz zu einem Glykoprotein (TDF 031), welche in Organismen zahlreiche Funktionen erfüllen wie z.B. als strukurelle Bestandteile in Zellmembranen und zur Zellinteraktion. Für 10 % der TDFs konnten keine homologen ESTs identifiziert werden. Alle sequenzierten TDFs können für weitere Analysen und die Markerentwicklung genutzt werden.

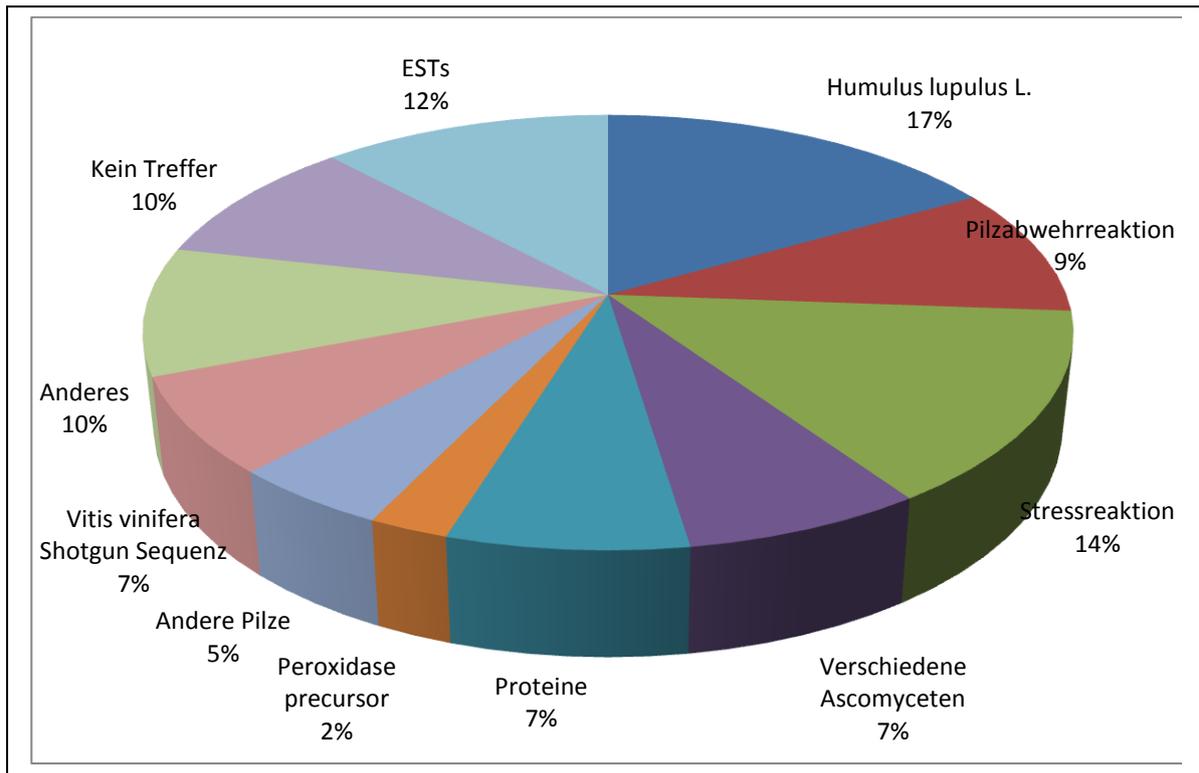


Abbildung 25: Gruppierung Mehlaupilz-induzierter Genfragmente. Grundlage für die Einteilung ist ihre Homologie mit BLAST-Abfrage.

3.7 Ableitung von genomischen Selektionsmarkern aus polymorphen Transkripten

Die cDNA-AFLP-Methode kann zusätzlich zur Detektion von differentiell exprimierten Genen auch zum Auffinden von Polymorphismen in der Restriktionsschnittstelle und/oder Primerbindungsstelle führen. Aus den sequenzierten TDFs können genspezifische Marker für den Resistenzgenlocus *R_{WH18}*-Gen entwickelt werden. Solche Marker könnten genutzt werden, um den Genlocus über einen kartengestützten Klonierungsansatz zu kartieren und so das Resistenzgen zu identifizieren. Um die generierten Polymorphismen aufzuklären und funktionelle Marker zu entwickeln, mit denen auf genomischer Ebene selektiert werden kann, wurden zunächst Alignments zwischen homologen ESTs, welche in einer BLAST-Abfrage detektiert wurden, und den ausgewählten TDFs durchgeführt. Die Sequenz der TDFs wurde über die flankierenden Schnittstellen hinaus verlängert und Primerpaare, die diese Schnittstellen umschlossen, wurden entwickelt. Für elf TDFs wurden nach diesem Verfahren

spezifische Primer entwickelt. Anschließend wurden PCR-Analysen mit diesen Primern durchgeführt, wobei sowohl die cDNA als auch die genomische DNA der jeweils resistenten und anfälligen Eltern als Template eingesetzt wurde. Von den elf sequenzierten genomischen PCR-Produkten konnten keine Sequenzunterschiede zwischen den Eltern der Kartierungspopulationen detektiert werden.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden bisher unbekannte Resistenzen gegenüber Echtem Mehltau aus dem Wildhopfen aus der Eifel (WH18) und aus einem japanischen Zuchtstamm (JAP-C845), die beide in das Hüller Zuchtmaterial bereits eingekreuzt sind, bearbeitet. Dabei sollten zunächst Selektionsmarker für diese neuen Resistenzen auf genomischer Ebene unter Einsatz der AFLP- und der SSR-Technik identifiziert werden. Darüber hinaus sollten erstmals Einblicke in die bei der Abwehr des Mehltaupilzes beteiligten Gene der Sämlinge von WH18 mit Hilfe der cDNA-AFLP-Methode ermöglicht werden.

4.1 Kreuzungseltern

Die Wahl der Kreuzungseltern ist abhängig vom jeweiligen Züchtungs- bzw. Forschungsziel und bestimmt zu einem großen Teil den Rahmen der Möglichkeiten, diese Ziele zu erreichen. Für einen Züchter ist es generell wichtig, eine große Variation in der Kreuzungsnachkommenschaft zu erzeugen, um damit eine möglichst hohe Wahrscheinlichkeit für die Selektion neuer Genotypen mit besseren Merkmalsausprägungen oder neuen Merkmalskombinationen zu erhalten.

Kreuzungen aus einem engen Genpool bringen den Vorteil mit sich, dass bereits in einer Kreuzung eine neue Hopfensorte selektiert werden kann. Der europäische Genpool besitzt im Vergleich zum Bitterhopfenpool (Seefelder et al, 2000) und zum Gesamthopfengenpool (Cerenak et al., 2004) eine engere verwandtschaftliche Beziehung. Mit Hilfe einer Clusteranalyse nach dem UPGMA- („unweighted pair group method with arithmetic averages“) Verfahren zeigte Seefelder (Seefelder, unveröffentlicht) die Verwandtschaftsgruppen innerhalb eines ausgewählten internationalen Hopfensortiments auf (siehe Kapitel 2.2, Abb. 6). Im Vergleich zum 2000 publizierten Stammbaum von Seefelder et al. (2000) wurden neue Hüller Zuchtstämme und v.a. die neuen Mehltaresistenzquellen des aus der Eifel stammenden Wildhopfen WH18 und des japanischen Stammes JAP-C845 mit aufgenommen. Die Schätzwerte für die genetischen Ähnlichkeiten wurden in Form einer genetic similarity (GS)-Matrix nach dem Koeffizienten von Dice (1945) bestimmt. Da es bislang keine

Aromasorten gibt, die eine sehr gute Mehлтаuresistenz besitzen (siehe Kapitel 1.4, Tab. 2), war es ein großes Ziel in der Hüller Hopfenforschung, eine neue, breite Mehлтаuresistenz in den Aromabereich einkreuzen und für die neuen Resistenzen molekulare Marker für eine markergestützte Selektion zu generieren. Wye Target, der das in der Hallertau noch voll wirksame Resistenzgen R_2 trägt, wäre auf Grund seiner relativ großen verwandtschaftlichen Distanz zu den Hüller Aromasorten und der damit verbundenen großen Variabilität in den Nachkommenschaften ein potentieller Kreuzungspartner. Da diese Sorte aber ein weniger feines Aroma aufweist, ist Wye Target trotz guter Mehltau-Resistenzigenschaften als Kreuzungspartner für die Schaffung von Sorten mit feinen Aromaqualitäten weniger geeignet.

Der Wildhopfen WH18 war daher sowohl auf Grund seiner guten Resistenzigenschaften gegenüber dem Echten Mehltau als auch auf Grund seines feinen Aromas ein idealer Kreuzungspartner. Obwohl es sich bei dem Kreuzungselter aus WH18 um direkte Nachkommen aus einem Wildhopfen handelt, ist er relativ nah verwandt mit dem Hüller Zuchtmaterial. Die Erklärung hierfür liefert die Züchtungsgeschichte der Hüller Hopfensorten. Um die Widerstandsfähigkeit der Landsorten gegenüber *Pseudoperonospora humuli* (Falscher Mehltau bei Hopfen) zu erhöhen, wurden Wildhopfen aus dem deutschen und europäischen Raum selektiert und mit den alten Landsorten gekreuzt. Dadurch besitzen europäische Wildhopfen, die auch den Wildhopfen WH18 einschließen, und der Genpool des Hüller Zuchtmaterials eine große genetische Ähnlichkeit. Erst ab den 1970/80er Jahren wurde nordamerikanisches Material eingekreuzt, um höhere Alphasäuregehalte und auch *Verticillium*-Resistenz zu bekommen. Alle hier eingesetzten und untersuchten Kreuzungseltern, bis auf den japanischen Wildhopfen JAP-C845 und Wye Target (Großcluster „europäischer und nordamerikanischer Ursprung“), sind in dem Großcluster „Aromahopfen“ vertreten, die v.a. auf europäischem Genmaterial beruhen (siehe Kapitel 2.2, Abb. 6). Diese enge Verwandtschaft zeigte sich auch bei der AFLP-Analyse der Kartierungspopulationen durch einen relativ niedrigen Polymorphiegrad in den Kartierungspopulationen (siehe Kapitel 3.4.1, Tab. 20).

Der durchschnittliche Polymorphiegrad in den einzelnen Primerkombinationen lag in den vier Kartierungspopulationen bei ca. sechs polymorphen Banden je Primerkombination. Der vermutete höhere Polymorphiegrad in der Kreuzung WH18/97/003 mit dem Bitterhopfen Wye Target, die dem Stammbaum nach genetisch

weiter voneinander entfernt sind, spiegelte sich nicht in einer höheren Anzahl an polymorphen Banden wider. Die für die erste Kopplungskarte bei Hopfen verwendete Kreuzungspopulation aus Wye Target mit dem Hüller Zuchtstamm 85/54/15 wies einen höheren Polymorphiegrad mit durchschnittlich 9,4 Polymorphismen pro Primerkombination auf (Seefelder et al., 2000). Auch bei der damaligen Kartierung wurde das Enzymsystem *EcoRI/MseI* verwendet.

Es wurden sogenannte „two way pseudotestcross“-Kartierungspopulationen geschaffen. „Two way pseudotestcross“ beschreibt die Kreuzung zweier heterozygoter Eltern, in deren Nachkommenschaft Marker detektiert werden können, die heterozygot in einem oder beiden Eltern sind (Maliepaard et al., 1998). Diese Art von Kartierungspopulationen hat sich bei verschiedenen holzigen Pflanzen wie *Populus sp.* (Cervera et al., 2001), *Salix viminalis* (Hanley et al., 2002), Apfel (Maliepaard et al., 1998) und bei Wein (Lodhi et al., 1995) also bei Pflanzen, die ebenfalls von einer starken Heterozygotie geprägt sind, bewährt. Für die Suche nach Resistenzmarkern und die anschließende genetische Kartierung wurden vier Populationen mit Kreuzungen aus jeweils einem anfälligen, aber in anderen Eigenschaften interessanten Zuchtstamm bzw. Sorte, und verschiedenen mehlttauresistenten Sämlingen des Wildhopfens WH18, der ein neues Resistenzgen R_{WH18} gegenüber dem Echten Mehltau vermittelt, generiert. Darüber hinaus wurden zwei gezielte Kreuzungen zweier resistenter Eltern geschaffen. Durch die Pyramidisierung zweier Resistenzgene soll eine längerfristige Wirksamkeit gegenüber dem Echten Mehltau gewährleistet werden. Dabei wurde die neue Resistenz des Wildhopfens WH18 einmal mit der Resistenz aus Wye Target (R_2) und einmal mit einer ebenfalls noch unbekanntem Resistenz aus dem Japanischen Wildhopfen JAP-C845 ($R_{JAP-C845}$) kombiniert.

4.2 Phänotypische und genetische Fakten der Mehlttauresistenz bei Hopfen

Resistenzen werden oft von ein oder zwei Hauptgenen („major genes“) und mehreren Nebengenen („minor genes“) genetisch bedingt (Kicherer et al., 2000). Die Hauptgene reagieren dabei spezifisch auf den eigentlichen Stress, aber im Hintergrund startet eine Kaskade mehr oder weniger spezifischer Abwehrgene, um die Pflanze zu schützen.

Die im internationalen Hopfensortenspektrum vorhandenen Resistenzgene stellen keine große Vielfalt von Resistenzgenen dar. Im Vergleich zu den mehr als 85 rassenspezifischen Resistenzgenen in der Gerste gegen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Jørgensen, 1994), ist die Anzahl der acht bekannten Resistenzgene im Hopfen gegen *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* sehr gering (siehe Tab. 1). Die Resistenzzüchtung in Hüll/ Deutschland beschränkte sich in den letzten Jahren fast ausschließlich auf das Resistenzgen der englischen Sorte Wye Target, das auf dem dominanten Hauptgen R_2 und auf den als „genetischen Hintergrund“ beschriebenen Minorgenen beruht (Darby und Gunn, 1987). Diese Resistenz ist als einzige Resistenz des Hopfens gegenüber dem Echten Mehltau in der Hallertau noch voll wirksam. Um neue Resistenzquellen zu erschließen, wurden verschiedene Wildhopfen in das Hüller Zuchtmaterial eingekreuzt. Im Gegensatz zu anderen gut untersuchten Wirt/Pathogen-Interaktionen, wie das Pathosystem Gerste-Echter Mehltaupilz, ist über das Pathosystem Hopfen-Echter Mehltaupilz relativ wenig bekannt. Auch über die Funktion und Identität der Resistenzgene ist nicht viel bekannt. Henning and Moore (1999) identifizierten ein Endochitinase-Gen (*HCHI*) aus der mehltaresistenten englischen Sorte Zenith, welches möglicherweise eine Rolle bei der Abwehrreaktion gegenüber Pathogenen spielen könnte. Oberhollenzer et al. (2011) untersuchte im Rahmen eines Forschungsprojektes die Interaktion Hopfen-Hopfenmehltau in verschiedenen resistenten Wildhopfen. Bei der inkompatiblen Interaktion zwischen Mehltaupilz und Hopfenzelle konnte beobachtet werden, dass die Resistenz der meisten hier untersuchten Wildhopfens 24 h nach Inokulation auf dem Zelltod der angegriffenen Zellen beruht (= hypersensitive Reaktion). Lokale Zellwandverdickungen (= Papillen), wie sie bei anderen Kulturarten als Abwehrreaktion gegenüber Echtem Mehltau auftreten, scheinen bei Hopfen keine große Rolle zu spielen (Oberhollenzer et al, 2011; Oberhollenzer und Seigner, 2012).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen keine Informationen über den Infektionsprozess, die Resistenzreaktion oder die Wirkmechanismen der Resistenz des Wildhopfens WH18 gegenüber dem Echten Mehltau vor. Erste makroskopische Untersuchungen zu diesem Wildhopfen WH18 und anderen Hopfensorten wurden am Hopfenforschungszentrum Hüll im Rahmen einer Diplomarbeit (Schlagenhauser, 2006) gemacht. Schlagenhauser (2006) stellte fest, dass die Resistenz weder morphologisch,

noch histologisch erklärt werden kann. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Trichome bei sechs verschiedenen gegenüber dem Echten Mehltau anfälligen und resistenten Sorten festgestellt werden. Die Wachsmenge auf den Blättern erreichte zwar bei den resistenten Sorten Hallertauer Merkur und Wye Target mit knapp 4 bzw. 3,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ die höchsten Werte im Vergleich von sechs Sorten, war aber auf dem Niveau der anfälligen Sorten ($\sim 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Signifikante Unterschiede bei den Lupulindrüsen korrelierten nach Schlagenhauser eher mit den Hopfeninhaltsstoffen als mit der Resistenz. Sortenspezifische Unterschiede in der Protein- und Kallosemenge und der Cuticuladicke waren nicht signifikant und korrelierten ebenfalls nicht mit der Resistenz (Schlagenhauser, 2006). Die Bonitur der Kartierungspopulationen nach der Inokulation mit dem Echten Mehltau, zeigte eine klare Abgrenzung der resistenten von den anfälligen F_1 -Nachkommen. Im Gegensatz zu früheren an der LfL durchgeführten Auswertungen des Resistenztest von Nachkommen der resistenten Sorte Wye Target, bei denen neben überwiegenden Bonituren von voll resistent bis hoch anfällig auch vereinzelt Zwischenstufen bonitiert wurden (Seefelder, persönliche Mitteilung), spalteten die Blätter von Nachkommen aus WH18 x anfällig ganz klar in völlig symptomlos (Bonitur 0), oder sehr starken Mehлтаubefall (Bonitur 1). Dies unterstützt die Hypothese, dass es sich bei der von WH18 vermittelten Resistenz um eine monogenisch vererbte Resistenz handelt und nur ein dominantes Gen an der Ausprägung der Resistenz von beteiligt ist. Somit scheint es sich bei der Resistenzreaktion von WH18 um einen anderen Mechanismus zu handeln als bei der Resistenzreaktion von Wye Target. Zwar zog Seefelder et al. (2005) bei der Kartierung des R_2 -Gens durch das Spaltungsverhältnis von 1:1 von resistenten zu anfälligen Nachkommen die Schlussfolgerung, dass es sich bei dem Resistenzgen R_2 um ein dominantes Gen handeln muss, dennoch wird vermutet, dass die auf dem Hauptgen (R_2) beruhende Resistenz von Nebengenen unterstützt wird (Seigner et al., 2002). Sorten können neben den vertikalen oder auch qualitativen (rassenspezifischen) Resistenzeigenschaften oftmals zusätzliche horizontale (quantitative, rassenspezifische) Resistenzeigenschaften besitzen. Dadurch kann die Resistenzwirkung der qualitativen Resistenzgene durch quantitative Abwehrmechanismen maskiert oder überlagert sein. Sie können jedoch dazu führen, dass Sorten mit gleichen qualitativen Resistenzeigenschaften voneinander abweichende Befallsbewertungen erhalten können (Felsenstein und Baser, 2000). Dieser sog. quantitative Resistenzsockel, wie er wahrscheinlich bei der von Wye

Target vermittelten Resistenz vorliegt, wird auch bei anderen Arten wie z. B. dem Weizen für Resistenzgen Pm6 gegenüber dem Weizenmehltau beschrieben (Felsenstein und Baser, 2000).

Eine genauere Charakterisierung der Interaktion Hopfen-Mehltau bei dem resistenten Wildhopfen WH18 wird aktuell erforscht (Oberhollenzer et al., 2011; Oberhollenzer und Seigner, 2012), da die neuen Resistenzträger und deren Nutzung bei der Züchtung von mehlttauresistenten Hopfen von enormer Bedeutung sind.

Die untersuchten Kreuzungen mehlttauresistenter x mehlttauanfälliger Eltern wiesen in drei Fällen mehr resistente als anfällige Individuen in der Population auf. Bei der vierten Kreuzung zwischen Opal x WH18/97/003 lag das Verhältnis ziemlich ausgeglichen bei 67 resistenten und 73 anfälligen Genotypen. Trotz der höheren Anzahl von resistenten zu anfälligen Pflanzen kann angenommen werden, dass das Resistenzgen R_{WH18} entweder als ein qualitatives, dominantes Gen oder als Block eng gekoppelter quantitativer Gene vererbt wird, die nicht durch einen Kopplungsbruch getrennt werden können. Vertikale Resistenz bietet für meist kurze Zeit einen nahezu 100%igen Schutz im Gegensatz zur horizontalen Resistenz, bei der es nur zu einer eingeschränkten Sporenproduktion und –vermehrung kommt (Seigner et al., 2002). Eine eindeutige Differenzierung von horizontaler und vertikaler Resistenz ist aber oft sehr schwierig (Van der Plank, 1984; Zeller et al., 1993; Hoffmann et al., 1994). Obwohl Jacobs und Broers (1989) die Meinung vertreten, dass dauerhafte Resistenz nicht von der Genanzahl oder dem Erbgang abhängt, wird im Allgemeinen monogenischen Resistenzen eine kurzfristige Wirkung zugesprochen als oligo- oder polygenischen (Parlevliet, 1993). Die in dieser Studie untersuchten Resistenzen sind aller Wahrscheinlichkeit nach monogenisch vererbt. Da Hopfen aber überwiegend in Monokultur angebaut wird und als perennierendes Gewächs dem Erreger eine ständige Vermehrungsmöglichkeit bietet, besteht die große Gefahr, dass die Resistenz schnell durchbrochen wird und es zu einem völligen Zusammenbruch der Resistenz kommt. Durch die genetische Anpassung des Erregers (Miedaner, 2010), z.B. durch Mutationen oder auch durch Rekombination in der sexuellen Phase, kommt es zu einer Virulenzselektion, was zu einer neuen Erregerrasse führt, wodurch die Resistenz unwirksam wird. Auf Grund der genetischen Uniformität der Pflanzen (Klonvermehrung) kann sich ein erfolgreiches Pathogen sehr schnell (epidemisch) im

gesamten Bestand ausbreiten. So wurde die von der englischen Sorte Wye Challenger vermittelte Resistenz (R_B und R_3) gegenüber dem Echten Hopfenmehltau bereits nach zwei Anbaujahren durchbrochen, genauso wie die Resistenz R_I aus der Sorte Zenith (Gunn, 1987). Auch bei Resistenzen gegen Mehltau, Zwergrost und Mosaikvirus der Gerste wurde dieses Problem beobachtet. Der Einsatz monogener, rassenspezifischer Resistenzen erfordert vom Züchter stets eine weitere Selektion von neuen Genen, da nur selten dauerhafte monogenische Resistenzen gefunden werden.

Es wird angenommen, dass eine Kombination mehrerer Resistenzgene zu einer dauerhafteren Widerstandsfähigkeit bzw. zu einer verminderten Sporulation des Pilzes bei Befall führt (Seigner et al., 2002). Die Einkreuzung verschiedener Resistenzquellen entspricht einer Pyramidisierung. Bei Weizen, Reis, Gerste, Apfel und anderen Kulturarten wurden ebenfalls Resistenzgene pyramidiert (Roelfs et al., 1992; Boskovic et al., 2001; Werner, 2002; Kellerhals et al., 2009), um die Resistenz bzw. deren Dauerhaftigkeit zu erhöhen.

4.3 Molekulare Marker und genetische Kartierung

4.3.1 Molekulare Marker

4.3.1.1 Resistenzmarker für die Resistenzgene R_{WH18} und $R_{JAP-C845}$

Einen Schwerpunkt am Hopfenforschungszentrum Hüll stellt die Entwicklung molekularer Selektionsmarker für die Mehltauresistenz beim Hopfen dar, da der Erreger des Echten Mehltaus (*Podosphaera macularis* ssp. *humuli*) nach wie vor das wirtschaftlich bedeutendste Pathogen im Hopfenanbau darstellt.

Molekulare Marker, die mit bestimmten Züchtungsmerkmalen gekoppelt sind, eröffnen neue Möglichkeiten für eine beschleunigte Züchtung verbesserter Hopfensorten. Diese Marker erlauben eine effizientere und gezieltere Selektion nach Sämlingen in der Nachkommenschaft, die die gewünschten Eigenschaften besitzen. Ziel dieser Arbeit war es daher, molekulare Marker für zwei neue Resistenzen zu erarbeiten, die von dem deutschen Wildhopfen WH18 und dem japanischen Wildhopfen JAP-C845 vererbt werden. Beide Wildhopfen waren bereits zur Einkreuzung dieser in ihren Eigenschaften

und ihrer Vererbung noch weitgehend unbekanntem Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Echten Mehltau in der Hüller Züchtung genutzt worden. Vielversprechend erschien vor allem auch die Möglichkeit, durch die gezielte Kombination beider Resistenzen in einer neuen Sorte eine länger andauernde und stärker wirksame Widerstandsfähigkeit zu erhalten. Voraussetzung für die Identifizierung eng mit der Mehltaresistenz gekoppelter molekularer Marker sind zuverlässige Resistenzbonituren der Kartierungspopulationen. Hierbei konnte ein bereits etabliertes und zuverlässiges Blattscreeningsystem genutzt werden. Das miniaturisierte *In-vivo*-Infektionssystem, das von der LfL in Kooperation mit EpiLogic erarbeitet worden war (Seigner et al., 2002), wird bereits seit dem Jahr 2000 für das Resistenzscreening aller Kartierungspopulationen am Hopfenforschungszentrum Hüll eingesetzt. Es hat sich als zuverlässiges und aussagekräftiges Resistenztestsystem bewährt. Unter Einsatz von Einzelsporisolen, die von ihrer Virulenz genau charakterisiert sind und die jedes Jahr erneut hinsichtlich ihrer Virulenzgene getestet werden, konnten recht zuverlässige Resistenzbonituren für die verschiedenen Kartierungspopulationen produziert werden. Durch den Einsatz von Mehltausolaten mit definierter Virulenz war es möglich, das Wirken der spezifischen Resistenzgene R_{WH18} , $R_{JAP-C845}$ und R_2 nachzuweisen. Im Gegensatz zu Feldbonituren konnten Vermischungen von Isolaten ausgeschlossen werden. Ein weiterer Vorteil des standardisierten Labortests gegenüber Feldbonituren besteht darin, dass andere Stressfaktoren wie Hitze oder Trockenheit keinen Einfluss auf die Ausprägung der Resistenz ausüben können.

Mit dem Blatt-Resistenzprüfsystem konnte eine klare Differenzierung in resistente und anfällige F₁-Nachkommen getroffen werden. So waren die Blätter von WH18-Nachkommen entweder völlig ohne Mehltaubefall (Boniturnote 0) oder wiesen sehr starken Befall (Boniturnote 1) auf. Nimmt man an, dass eine Ja-Nein-Reaktion (100 % bzw. 0 % Befall) auf das Fehlen bzw. Vorhandensein eines Majorgenes (vertikale Resistenz) zurückzuführen ist, unterstützten diese Beobachtungen die Vermutung, dass es sich bei der Resistenz von WH18 um eine monogene Resistenz handelt, während an der Resistenzausprägung von Wye Target ein R_2 -Hauptgen und mehrere Nebengene beteiligt sind (Seigner et al., 2002).

Die „bulk segregant analysis“-Methode gilt als eine schnelle und einfache Technik, um spezifische Regionen im Genom zu erforschen und innerhalb dieser Region

molekulare Marker für ein Zielgen zu identifizieren (Michelmore et al., 1991). Dafür wurden spaltende Populationen aus einer Kreuzung erstellt, deren Eltern sich im gesuchten Merkmal unterscheiden. Mit der „bulk segregant analysis“-Methode konnten schon erfolgreich Resistenzmarker für z. B. den Echten Mehltau bei Wein (Donald et al., 2001) oder dem Echten Mehltau bei Apfel (James et al., 2004) und auch bei Hopfen (Seefelder et al., 2005) mit AFLPs identifiziert werden.

Anhand von verschiedenen spaltenden Kartierungspopulationen sollte aufgrund der Vererbung der WH18- und JAP-C845-Resistenz erstmalig nachgewiesen und überprüft werden, wie viele Gene beteiligt sind.

Die Markersuche wurde wie bei den vorausgegangenen Arbeiten beim Hopfen (Seefelder et al., 1997, Seefelder et al., 1998; Seefelder et al., 1999, Seefelder et al., 2005; Cerenak et al. 2006; Jakse et al., 2010) auf der Grundlage der F₁-Nachkommenschaften durchgeführt. Für die WH18-Resistenz konnten zwei AFLP-Marker (PxxMxx_292 und PxxMxx_290) identifiziert werden, die mit der Ausprägung der Mehltaresistenz gekoppelt sind. Ein kritischer Punkt beim Einsatz molekularer Marker kann sein, dass ein Marker nur für die Nachkommenschaften optimal eingesetzt werden kann, für die er entwickelt wurde. Molekulare Marker, die aus verschiedenen speziellen Kreuzungen erarbeitet wurden und mit jeweilig verschiedenen Mehltaresistenzgenen gekoppelt sind, haben zunächst nur in diesem und den davon abstammenden genetischen Material diagnostischen Wert. Bei Individuen, die aus unterschiedlichen Kreuzungen entstanden sind und nicht direkt miteinander verwandt sind, hängt der diagnostische Wert eines Markers von der Rekombinationsfrequenz zwischen Marker und dem gekoppelten Resistenzgen ab. Marker liegen meist in Bereichen außerhalb des für das Zielgen verantwortlichen Exons. Sie werden umso sicherer, je näher sie am Zielgen liegen. Besonders interessant sind universelle Marker, die direkt im Zielgen liegen. Ein Marker-Allel, das mit einem Resistenzgen physikalisch eng gekoppelt ist, oder mit diesem identisch ist, wird zusammen mit der Resistenz vererbt. Die beiden WH18-Marker liegen in einer geringen Distanz von 2,2 cM zum Mehltaresistenzlocus und sind somit eng gekoppelt mit dem Zielgen. Dadurch können sie für eine effiziente markergestützte Selektion mehltaresistenter Hopfensämlinge eingesetzt werden. Der Marker PxxMxx_292 konnte in allen als resistent eingestuftem Wildhopfen des Ursprungs Eifel und in allen Zuchtstämmen, die mit dem Wildhopfen Eifel gekreuzt wurden, erfolgreich verifiziert werden.

Der Marker ExxMxx_423, der für das Resistenzgen aus dem Wildhopfen JAP-C845 identifiziert wurde, scheint mit einem genetischen Abstand von 0 cM auf dem Resistenzlocus zu liegen. Zur Verifizierung des Markers wären weitere Kreuzungen nötig. Da die Resistenz des japanischen Wildhopfens aber in der Zwischenzeit gebrochen wurde, wurden keine weiteren Kreuzungen mit diesem Wildhopfen durchgeführt.

Die eingekreuzten neuen Mehltaresistenzen wiesen eine starke Wirkungsweise in den untersuchten Populationen auf. Insbesondere das Resistenzgen aus dem Wildhopfen Eifel führte zu einer 100%igen Resistenzreaktion gegenüber dem Befall mit Echtem Mehltau in allen Nachkommenschaften, die den Resistenzmarker zeigten. Durch die enge Kopplung des Markers mit dem Zielgen ist es nun Aufgabe, diesen AFLP-Marker zur Anwendung in der markergestützten Selektion in einen spezifischen PCR-Marker zu überführen. 2008 ist durch die Entwicklung einer neuen Mehltaurasse diese Resistenz, die von WH 18 ausgeht, gebrochen worden.

Die Züchtungsgeschwindigkeit spielt im Züchtungsprozess eine wichtige Rolle. Eine schnelle, markergestützte Sortenentwicklung durch eine Kumulierung verschiedener Mehltaresistenzgene (Pyramidisierung) in einzelnen Zuchtstämmen erlaubt eine frühere und längere Nutzung von Resistenzgenen und wirkt dem oft schnellen Verlust der Resistenzwirkung durch sich neu entwickelnde Pathogenrassen entgegen. Neben der additiven Wirkung unabhängig voneinander vererbter Resistenzgene können auch epistatische Effekte eine Rolle spielen (Bai et al., 2000). Bei additiver Genwirkung kann die Pyramidisierung von verschiedenen Resistenzgenen zur Transgression führen (Snijders, 1990). Aus diesem Grund wurden zwei Kreuzungen erstellt, in der die bis dahin noch voll wirksame WH18-Resistenz mit den ebenfalls noch nicht durchbrochenen Resistenzgenen R_2 (Wye Target) und $R_{JAP-C845}$ (enthalten im Stamm 92/076/721) kombiniert werden sollten. Da die jeweiligen Kreuzungseltern die entsprechenden Marker für die R_2 -, die R_{WH18} - und die $R_{JAP-C845}$ Resistenz tragen, konnte bei den bearbeiteten Kreuzungspopulationen von einer unabhängigen Segregation der auf englische (R_2) und deutsche (R_{WH18}) bzw. auf deutsche (R_{WH18}) und japanische ($R_{JAP-C845}$)-Quellen zurückzuführenden Resistenzeigenschaften ausgegangen werden. Dadurch traten in den Kreuzungspopulationen Individuen auf, die eine Kombination beider Resistenzen aufwiesen, also deren Resistenzen pyramidiert sind. Ähnliche Strategien

wurden auch in der Apfelmzüchtung gegenüber Schorfresistenz (Kellerhals et al., 2009), in der Rebenzüchtung gegenüber dem Falschen Mehltau (Schwander and Eibach, 2009) und in der Gerstenzüchtung für divergente Gelbmosaikvirus-Resistenzgene (Werner, 2002) verfolgt.

Weitere Resistenzgene, z. B. gegen *Falschen Mehltau* oder *Verticillium*, könnten im weiteren Zuchtverlauf im gleichen Genotyp kombiniert werden.

Mit der Erweiterung der genetischen Basis der Resistenz durch Introgression von Resistenzgenen aus Wildmaterial, wie sie in Hüll bereits seit vielen Jahren erfolgreich durchgeführt wird, und das sogenannte „Pyramiding“ von Resistenzgenen, wurden wichtige züchterische Möglichkeiten genutzt, um das Pathogen *Podospaera macularis* ssp. *humuli* auch in Zukunft unter Kontrolle zu halten. Resistenzgene aus Wildmaterial sind aber häufig mit qualitätsmindernden Genen gekoppelt (genetic linkage drag). Die Eliminierung dieser Gene kann mit molekularen Markern erreicht werden.

Henning et al. (2011) ist es erstmals beim Hopfen gelungen, molekulare Marker zu identifizieren, die mit QTLs gekoppelt sind, die mit der Anfälligkeits-Reaktion gegenüber dem Echten Mehltau assoziiert zu sein scheinen. Pavan et al. (2010) hält die Züchtungsstrategie der Selektion gegen Anfälligkeits-Genen als eine Methode, die der traditionellen Selektion auf Resistenz-Gene langfristig gesehen überlegen ist. Die Autoren begründen ihre These damit, dass eine Selektion gegen Anfälligkeits-Genen in einer horizontalen Resistenz und somit in einer dauerhafteren Resistenz resultiert. Eine Selektion auf Resistenz-Gene dagegen läuft auf eine vertikale Resistenz oder dem „Gen-für-Gen-Modell“ von Flor (1971) hinaus.

4.3.1.2 Geschlechtsmarker beim Hopfen

Die Geschlechtsausprägung beim Hopfen erfolgt nach dem klassischen Drosophila-System (Parker und Clark, 1991). Ist das Verhältnis der X-Chromosomen zu dem Autosomensatz $< 0,5$ entstehen männliche Pflanzen, bei einem Wert von 1 entstehen weibliche Pflanzen (Shephard et al., 1999). Geschlechtsgekoppelte Marker sind für die Hopfenzüchtung sehr hilfreich, da mit ihnen eine frühzeitige Selektion der männlichen Sämlinge möglich ist, sodass diese männlichen Hopfen schnell aus dem Hopfengarten entfernt werden können, bevor sie Blüten bilden und ihr Pollen mit dem Wind verbreitet

werden, was sich negativ auswirkt für den Brauwert der Dolden und somit auf den kommerziellen Hopfenanbau. Insgesamt konnten 36 AFLP und ein Mikrosatelliten-Marker identifiziert werden, die mit dem männlichen Phänotyp cosegregierten. Die meisten geschlechtsgekoppelten Marker konnten in der Kartierungspopulation Hallertauer Gold x WH18/97/003 nur bei den männlichen Hopfenpflanzen gefunden werden, d.h. nur in den männlichen Pflanzen wurden zusätzliche Fragmente amplifiziert. Bei den diözischen Kulturarten *Asparagus* (Jiang and Sink, 1997; Reamon-Büttner et al., 1998), *Atriplex garrettii* (Ruas et al., 1998), *Cannabis sativa* (Mandolino et al., 1999) und *Dioscorea tokoro* (Terauchi and Kahl, 1999) waren die geschlechtsgekoppelten Marker ausschließlich bei den männlichen Pflanzen vorhanden und in den weiblichen Pflanzen fehlend. Bei den Arten *Salix viminalis* (Semerikov et al., 2003) und *Pistacia vera* (Hormaza et al., 1994) dagegen wurde ausschließlich in den weiblichen Pflanzen ein zusätzliches geschlechtsspezifisches Fragment amplifiziert, welches in den männlichen Pflanzen fehlte. Da auch die männlichen Pflanzen immer ein X-Chromosom tragen, ist die Identifizierung von spezifischen X-Markern relativ schwierig. Dennoch konnten in der vorliegenden Arbeit Marker detektiert werden, die von beiden Eltern vererbt wurden und die in allen weiblichen Pflanzen vorhanden waren und in den männlichen Pflanzen ein 1:1 Spaltungsverhältnis aufwiesen. Bei diesen Markern könnte es sich um geschlechtsgekoppelte Marker handeln, die das X-Chromosom repräsentieren. Solche X-spezifischen Marker waren bereits von Seefelder et al. (2000) beschrieben worden.

In der vorliegenden Arbeit wich die Segregation der männlichen geschlechtsspezifischen Marker hochsignifikant ($P < 0.0001$) von der erwarteten 1:1 Spaltung ab (Kapitel 3.4.2, Tab. 21). Grund für diese verzerrte Spaltung ist ein signifikantes Ungleichgewicht von männlichen zu weiblichen Pflanzen in allen Kartierungspopulationen (siehe Kapitel 3.4.2, Tab. 23). Die weiblichen Individuen überwiegen gegenüber den männlichen Individuen innerhalb der Kartierungspopulationen. Das Verhältnis der weiblichen zu den männlichen Pflanzen variiert zwischen 3:1 bis 7:1 und scheint genotypenabhängig zu sein. Die Gründe für das Entstehen dieses signifikanten Ungleichgewichtes zwischen weiblichen zu männlichen Pflanzen sind bislang unbekannt. Das Phänomen wurde schon in anderen Arbeiten mit Hopfen beschrieben. Dabei variierte das Verhältnis von 2:1 (Neve, 1991), über 4:1 (Patzak et al., 2002) bis 6,9:1 (Cerenak et al., 2006). Das höchste

Ungleichverhältnis von weiblichen zu männlichen Pflanzen wurde bei Seefelder et al. (2000) mit einem Wert von 7,5:1 festgestellt. Mögliche Ursachen für das Geschlechterungleichgewicht könnten die Bestäubungsbedingungen, die genetische Konstellation der Kreuzungspartner, ein Inkompatibilitätssystem in den männlichen Gameten oder der Zeitpunkt der Samenkeimung sein (Haunold, 1991). Parthogenese konnte dabei für den Hopfen ausgeschlossen werden (Haunold, 1991).

Um das Y-Chromosom beschreiben zu können, wurden die Marker, deren gestörte Spaltung auf das gestörte Verhältnis von weiblichen zu männlichen Pflanzen zurückzuführen ist, bei der Verrechnung der genetischen Karte mit eingerechnet.

4.3.2 Genetische Kartierung

Beim Hopfen handelt es sich um eine diözische Kulturart, die im diploiden Zustand 20 Chromosomen besitzt. Der weibliche Hopfen besitzt neun bivalente Autosomen und zwei X-Chromosomen, der männliche Hopfen 18 Autosomen und ein X- und ein Y-Chromosom. Aus diesem Grund war es nötig, für beide Geschlechter separate Karten zu erstellen. Nach dieser Vorgehensweise wurde auch bei den bereits veröffentlichten Genomkarten von Hopfen (Seefelder et al., 2000; Cerenak et al., 2006; Jakse et al., 2010) und auch bei anderen Arten wie z.B. Apfel (Maliepaard et al. 1998), Wein (Lodhi et al., 1995) und Rose (Yan et al., 2005) vorgegangen.

Für die Erstellung der Chromosomenkarten wurden AFLP- und Mikrosatellitenmarker verwendet. AFLP-Marker haben sich beim Hopfen zur Sortendifferenzierung und Ermittlung der genetischen Variabilität, auf Grund ihres hohen Potentials Polymorphismen aufzudecken, bewährt (Seefelder et al., 1997; Seefelder et al., 1998; Seefelder et al., 2000; Jakse et al., 2001; Patzak, 2002a; Fleischer et al., 2004; Henning et al., 2004; Townsend and Henning, 2009). Mit dominanten Markern wie es AFLPs sind, ist es aber nicht möglich, ein sicheres Informationsspektrum über die Markersegregation speziell bei stark heterozyoten Kulturarten zu erhalten. Aus diesem Grund werden in neueren Arbeiten beim Hopfen vermehrt Mikrosatelliten-Marker, zum Teil in Kombination mit AFLP-Markern, bei den molekularen Analysen eingesetzt (Patzak, 2002; Cerenak et al., 2004; Murakami et al., 2006; Cerenak et al., 2006; Jakse et al., 2010; Henning et al., 2011). Mikrosatellitenmarker zur Erstellung genetischer Karten haben gegenüber AFLP-Marker u.a. den Vorteil, dass sie genortspezifisch sind

und codominant ausgewertet werden können. AFLP-Marker hingegen zeigen eine höhere Effizienz bei der Markergenerierung und ermöglichen eine schnellere Absättigung der Kopplungsgruppen.

In dieser vorliegenden Arbeit waren die Marker auf den Kopplungsgruppen sehr ungleichmäßig verteilt. 51 % der Marker, die für das männliche Genom kartiert wurden, befanden sich in der Kartierungspopulation Hallertauer Gold x WH18/97/003 auf der Kopplungsgruppe KG 1-m. Auf den weiblichen Kopplungsgruppen kartierten knapp 62 % der Marker auf der Kopplungsgruppe KG 1-w. Dies kann auf Grund von unterschiedlichen Rekombinationsfrequenzen und/oder Markeranzahl in den Genomabschnitten verursacht sein. Bei der Kartierung der Populationen Hallertauer Gold x WH18/97/003 und Wye Target x WH18/97/003 wurden auf einzelnen Kopplungsgruppen mehrere Markercluster beobachtet. DNA-Marker tendieren in der Nähe des Centromers zu clustern (Lodhi et al., 1995; Qi et al., 1998; Doligez et al., 2002; Strommer et al., 2002), so auch in dieser Arbeit z. B. auf der Kopplungsgruppe KG 1-w der Kartierungspopulation Wye Target x WH18/97/003 (Kapitel 3.5, Abb. 21 links). Auch bei der genetischen Kartierung von Mais clusterten vor allem die mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* generierten Marker bevorzugt im Centromerbereich des Chromosoms (Castiglioni et al., 1999). Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache liegt in der Unterdrückung der Rekombination in den chromosomalen Bereichen, zu denen das Centromer zählt (Tanksley et al., 1992; Hanley et al., 2002). Es wird aber auch angenommen, dass die Cluster den hoch methylierten zentromerischen Regionen entsprechen (Doligez et al., 2002). Neben Clustern in der Centromerregion der Chromosomen, waren aber auch einzelne Cluster außerhalb dieser Region, nämlich im Telomerbereich der Chromosomen zu finden, so z. B. auf der Kopplungsgruppe KG 4-w der Kartierungspopulation Wye Target x WH18/97/003 (Kapitel 3.5, Abb. 21 rechts). Diese Clusterbildungen im Telomerbereich konnten auch beim Wein (Lodhi et al., 1995) detektiert werden. Song et al. (2004) berichteten in ihrer Arbeit mit der Sojabohne, dass das Clustern von Markern vor allem in genreichen Regionen auftritt. Cluster von Markern mit gestörter Spaltung, wie sie in der vorliegenden Arbeit vorkommen, werden häufig vor allem bei Fremdbefruchtern beschrieben (Yan et al., 2005). Marker mit einem abweichenden Spaltungsverhältnis sind oft mit Genen gekoppelt, die interessant sind für eine direkte Selektion (Cervera et al., 2001). Letalgene (Pillen et al., 1992; Bradshaw and Stettler, 1994; Yan et al., 2005) oder

Fertilitätsfaktoren (Wricke und Wehling, 1985; Yan et al., 2005) für Gameten- oder Zygotenselektion sind bei Fremdbefruchtern ein möglicher Erklärungsansatz (Wagner et al., 1992) für die abweichenden Spaltungsverhältnisse in gewissen Genombereichen. Die meisten Marker mit einem gestörten Spaltungsverhältnis wurden in dieser Arbeit auf der Kopplungsgruppe KG 1-m in der männlichen Karte beobachtet. Bei diesen Markern handelt es sich um sogenannte Geschlechtsmarker, die mit dem männlichen Phänotyp clustern (vergleiche Tab. 21). Auch bei Apfel wurden Marker mit einer gestörten Spaltung hauptsächlich bei den männlichen Allelen festgestellt (Maliepaard et al., 1998). Wie in Kapitel 4.3.1.2 beschrieben, ist das gestörte Spaltungsverhältnis auf die abnorme Verteilung von männlichen zu weiblichen Pflanzen zurückzuführen, das in den verschiedenen Kartierungspopulationen zwischen 3:1 bis 7:1 (weiblichen zu den männlichen) variierte. Auf derselben Kopplungsgruppe KG 1-m befindet sich ein Cluster mit doppelt heterozygoten Markern, die bei allen 112 weiblichen und bei 50 % der männlichen F₁-Individuen auftraten. Bei diesen Markern könnte es sich um X-spezifische Marker handeln. Wenn es sich bei diesen Marker um X-spezifische Marker handelt, müssten sie eigentlich auf einer weiblichen Kopplungsgruppe liegen, die dann das X-Chromosom repräsentieren würde. Auch bei einem LOD-Wert von 9 kartierte diese Gruppe von Markern nicht auf einer anderen Kopplungsgruppe. Ob es sich also wirklich bei diesen Markern um X-spezifische Marker handelt, kann nicht eindeutig geklärt werden. Geschlechtsspezifische Marker wurden schon bei anderen Kulturpflanzen wie z.B. *Asparagus officinalis* L. (Reamon-Büttner and Jung, 2000), *Humulus lupulus* L. (Seefelder et al., 2000; Patzak et al., 2002), *Poa arachnifera* Torr. (Renganayaki et al., 2005), *Pseudocalliogon trifarium* (Korpelainen et al., 2008), *Rumex acetosa* L. (Rahman and Ainsworth, 2004), *Salix viminalis* (Semerikov et al., 2003), *Spinacia oleracea* (Khattak et al., 2006) und bei *Cannabis sativa* L., einem sehr nahen Verwandten des Hopfens (Mandolino et al., 1999; Flachowsky et al., 2001; Peil et al., 2003), festgestellt. Bei Spargel konnten 24 geschlechtsspezifische AFLP- und STS-Marker auf dem homomorphen L5-Chromosom kartiert werden, welches das X und das Y Chromosom präsentiert (Reamon-Büttner and Jung, 2000). Bei Spinat (Khattak et al., 2006) und bei der Weinrebe (Dalbo et al., 2000) wurde bei einer Kartierung das Geschlecht als ein einzelnes Gen bzw. Genlocus auf einer Kopplungsgruppe identifiziert. Eine Kartierung heteromorpher Geschlechtschromosomen auf geschlechtsspezifischen Kopplungsgruppen ist bisher nur

bei Hopfen (Seefelder et al., 2000) gelungen. Das X-Chromosom hatte dabei eine Größe von 18,7 cM und das Y-Chromosom umfasste 7,6 cM. Dieses Größenverhältnis entspricht dem „Winge“-Typ (Winge, 1929), bei dem das X-Chromosom fast zweimal so groß ist wie das Y-Chromosom. Der „Winge“-Typ ist der bei Hopfen mit europäischem Ursprung am häufigsten vorkommenden Typ der Geschlechtschromosomen. Das Vorkommen eines kürzeren Y-Chromosomes im Vergleich zum X-Chromosom stellt dabei eine Ausnahme im Pflanzenreich dar (Ainsworth, 2000).

Eine Clusterbildung auf den Kopplungsgruppen bei der Verwendung der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *MseI* wurde schon in vielen Arbeiten bei anderen Pflanzen-Arten beobachtet (Castiglioni et al., 1999; Young et al., 1999; Doligez et al., 2002). Fischer et al. (2004) konnte dagegen bei QTL-Analysen beim Wein und Cerenak et al. (2006) bei der QTL-Analyse beim Hopfen keine Clusterbildung unter Verwendung des Enzymsystems *EcoRI/MseI* feststellen. Es wird vermutet, dass die Verteilung der AFLP-Marker im Genom von dem Methylierungsmuster der Restriktionsenzyme beeinflusst wird (Cerenak et al., 2006). Young et al. (1999) stellten bei ihren Untersuchungen ebenfalls fest, dass das Restriktionsenzym *PstI* auf Grund der Sensitivität gegenüber der Cytosin-Methylierung eine andere Verteilung der Marker im Genom der Sojabohne nach sich zieht als Marker, die mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* generiert wurden. Um eine gleichmäßigere und weitere Verteilung der Marker über das Genom zu erreichen, wurde neben dem bisher verwendeten Restriktionssenzym *EcoRI* zusätzlich das methylierungssensible Restriktionssenzym *PstI* eingesetzt (Young et al., 1999; Hanley et al., 2002, Cerenak et al., 2006). Die verwendeten *PstI/MseI*-Marker verteilten sich gleichmäßiger über die Kopplungsgruppen und konnten zusätzliche Chromosomenregionen abdecken. So konnte mit dem *PstI/MseI*-Enzymsystem der Resistenzlocus für das *R_{WH18}*-Gen kartiert werden. Allerdings konnten mit dem *PstI/MseI*-Enzymsystem insgesamt weniger Polymorphismen pro Primerkombination detektiert werden im Vergleich zu dem *EcoRI/MseI*-Enzymsystem. Cerenak et al. (2006) konnte mit dem Enzymsystem *EcoRI/MseI* im Vergleich zum *PstI/MseI*-Enzymsystem bei Hopfen insgesamt mehr Fragmente amplifizieren, allerdings war der Polymorphiegrad der Banden bei *PstI/MseI* um 20 % höher als bei *EcoRI/MseI*. Das Problem der Markeranhäufung am Centromer konnte durch den Einsatz des zusätzlichen Restriktionsenzym *PstI* in dieser Arbeit

nicht behoben werden. Eine weitere Möglichkeit zur besseren Abdeckung des Genoms wäre die Wahl größerer Kartierungspopulationen (van Heusden et al., 2000).

Die verwendeten Mikrosatelliten zeigten mit 71 % (Hallertauer Gold x WH18/97/003) bzw. 73 % (Wye Target x WH18/97/003) einen sehr hohen Polymorphiegrad. In anderen Kartierungspopulationen bei Hopfen konnten Polymorphiegrade von Mikrosatelliten mit 30,6 % (Jakse et al., 2010) bzw. 43,7 % (Jakse et al., 2008a) detektiert werden. Bei anderen Arten konnten Polymorphiegrade der SSR-Marker zwischen maximal 93,5 % bei *Actinidia* (Fraser et al., 2004) und minimal 9,7 % bei der Sojabohne (Hisano et al., 2007) generiert werden.

Die relativ geringe Anzahl polymorpher Marker bestätigte die Vermutung, dass trotz der Wildherkunft aus der Eifel der Verwandtschaftsgrad zu den Hüller Sorten bzw. Zuchtstämmen relativ eng ist (siehe Kapitel 2.2, Abb. 6). Der Vorteil von Kreuzungen mit relativ nah verwandten Eltern besteht darin, dass jeder polymorphe Marker eine größere Wahrscheinlichkeit hat, ein potentieller Locus für die gesuchte Eigenschaft zu sein. So stand bei der Auswahl der Kreuzungspartner eine gute Segregation des Resistenzmerkmals im Vordergrund. Für eine möglichst gute Abdeckung der genomischen Karten ist es generell wichtig, Kreuzungseltern auszuwählen, die eine möglichst große genetische Distanz zueinander aufweisen (Anderson et al., 1993).

Bei der Erstellung der Kopplungskarte für das Hopfengenom konnten bei der Kartierungspopulation Hallertauer Gold x männlicher Genotyp WH18/97/003 15 Kopplungsgruppen mit einer Markerdichte von 3 bis 93 Markern je Gruppe detektiert werden. Von den insgesamt 331 Markern (304 AFLP, 27 SSR) waren 118 Marker (108 AFLP, 10 SSR) auf den sechs mütterlichen Kopplungsgruppen lokalisiert und deckten 125,8 cM des weiblichen Genoms ab. 182 Marker (165 AFLP-Marker, 17 SSR-Marker) konnten den neun väterlichen Kopplungsgruppen zugeordnet werden und deckten 319,9 cM des männlichen Genoms ab. In der Kreuzung Wye Target x WH18/97/003 waren auf der mütterlichen Kopplungskarte 146 Marker (137 AFLP- und dominant ausgewertete SSR-Marker, 9 codominant ausgewertete SSR-Marker) verteilt auf sechs Kopplungsgruppen und deckten 226 cM des Genoms ab. Den väterlichen Kopplungsgruppen waren 50 Marker (36 AFLP- und dominant ausgewertete SSR-Marker, 14 codominant ausgewertete SSR-Marker) zugeordnet und repräsentierten das väterliche Genom mit einer Größe von 125 cM. Wurden bei der genomischen Karte von

Cerenak et al. (2006) 14 (weiblichen Karte) bzw. 12 (männliche Karte) Kopplungsgruppen gebildet, so dass die haploide Anzahl der Hopfenchromosomen ($n = 10$) übertroffen wurde, waren bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kartierungen einige Kopplungsgruppen nur relativ schwach mit Markern abgesättigt bzw. konnten ganze Kopplungsgruppen nicht erfasst werden. Zum einen könnte das in der Auswahl der Kreuzungseltern begründet sein. Dies trifft insbesondere auf die Kreuzung Hallertauer Gold x WH18/97/003 zu. Auf Grund des relativ geringen Polymorphiegrades zwischen den Kreuzungseltern blieben einige Bereiche des Genoms unkartiert. Denn wie bereits erwähnt, war bei der Auswahl der Kreuzungseltern eine gute Segregation des Resistenzmerkmals wichtiger als eine große genetische Differenz (siehe Kapitel 2.2, Abb. 6). Die Kreuzung Wye Target x WH18/97/003 stellte eine Kreuzung aus dem Genpool B mit europäisch-nordamerikanischen Genotypen und Genpool A mit überwiegend europäischem Ursprung dar. In der UPGMA-Cluster-Darstellung (Kapitel 2.2, Abb. 6) zeigt sich für die beiden Kreuzungspartner eine relative weite genetische Distanz. Trotzdem konnten bei der Kopplungsanalyse nur 226 cM des mütterlichen und 125,5 cM des väterlichen des Hopfengenoms abgedeckt werden. Im Vergleich zu den bisher veröffentlichten genetischen Karten von Hopfen, konnten bei den in dieser Arbeit produzierten Karten nur eine relativ schlechte Abdeckung des gesamten Hopfengenoms erreicht werden. Seefelder et al. (2000) generierte bei der ersten veröffentlichten Kopplungskarte beim Hopfen bei der Kreuzung von Wye Target mit der Hüller Zuchtlinie 85/54/15 eine weiblich Karte mit 346,7 cM und eine männliche Karte mit 227,4 cM mit insgesamt 177 Loci, wobei überwiegend AFLP-Marker des Enzymsystems *EcoRI/MseI* verwendet wurden. Eine, ebenfalls aus einer Kreuzung zwischen Wye Target und einer männlichen deutschen Zuchtlinie, erzeugte Karte konnte 320,6 cM des weiblichen und 237,4 cM des männlichen Genoms abdecken (Seefelder et al., 2005). Koie et al. (2005) konnte unter Verwendung weniger AFLP Marker eine genetische Karte darstellen, die lediglich 272 cM und 102 cM des weiblichen und männlichen Genoms abdeckte. Cerenak et al. (2006) generierten die bisher umfassendste genetische Karte des Hopfens mit 166 AFLP-Markern bei der Kreuzung von Hallertauer Magnum (deutsche Sorte) mit einer slowenischen Wildherkunft. Die weibliche Karte bestand aus 14 Kopplungsgruppen und deckte 661,9 cM des weiblichen Genoms ab, die männliche Karte setzte sich aus 12 Kopplungsgruppen mit einer Größe von 445,9 cM zusammen. Jakse et al. (2010)

erzeugte eine genetische Karte aus der Kreuzung Wye Target und einer männlichen slowenischen Zuchtlinie unter Verwendung von 104 Mikrosatelliten- und zwei STS-Markern. Die weibliche Karte bestand aus acht Kopplungsgruppen und deckte lediglich 161,6 cM des weiblichen Genoms ab, die männliche Karte bestand aus sieben Kopplungsgruppen und deckte 156,8 cM des männlichen Genoms ab. Die aktuellste genetische Karte stammt von Henning et al. (2011). Die Kreuzung aus der deutschen Sorte Perle und einem mehltresistenten amerikanischen Zuchtstamm ‚USDA 19058M‘ generierte acht weibliche Kopplungsgruppen mit einer Größe von 238,7 cM. Sieben Kopplungsgruppen deckten 529,5 cM des männlichen Elter ab.

Die vielen Cluster in beiden im Rahmen dieser Arbeit erstellten Kopplungskarten, wobei viele Marker 0 cM Distanz aufweisen und damit denselben Locus beschreiben, verminderten die gesamte Genomgröße. Die teilweise großen Lücken von bis zu 43,2 cM (KG 4-w der Kreuzung Wye Target X WH18/97/003) können durch „hot spots“ in der Rekombination erklärt werden (Cervera et al., 2001).

Eine Zuordnung der Kopplungsgruppen zu veröffentlichten Chromosomenkarten, wie z.B. der Kartierung von Cerenak et al. (2006) oder Jakse et al. (2010), ist durch den Einsatz von Mikrosatelliten, die auch in diesen Arbeiten verwendet wurden, zum Teil möglich. Der Geschlechtsmarker HIAGA7 koppelte sowohl in der Kartierung bei Cerenak et al. (2006) als auch in der Kartierungspopulationen Hallertauer Gold x WH18/97/003 mit dem männlichen Geschlecht auf der Kopplungsgruppe 1 der männlichen Karte. Die Mikrosatelliten HIGT16 und HIGAGA4 befanden sich sowohl bei dieser Arbeit in der Kreuzung Hallertauer Gold x WH18/97/003, als auch bei Cerenak et al. (2006) auf einer Kopplungsgruppe. In der Kartierungspopulation Hallertauer Gold x WH18/97/003 war es die Kopplungsgruppe KG 3-w und KG 3-m, in der Arbeit von Cerenak et al. (2006) KG 14 der weiblichen bzw. KG 12 der männlichen Karte. Ein weiterer Mikrosatellit (HIAGA6) kartierte bei Cerenak et al. (2006) auf der Kopplungsgruppe 5 der weiblichen bzw. 8 der männlichen Karte, in der Population Hallertauer Gold x WH18/97/003 kartierte er auf der Kopplungsgruppe KG 7-w bzw. KG 7-m.

Seefelder et al. (2005) kartierte erstmals das Resistenzgen R_2 aus Wye Target mit einem Abstand von zwei Markern von jeweils 1,6 cM zum Resistenzlocus. In dieser Arbeit konnte ein Marker (PxxMxx_201) gefunden werden, der in einem Abstand von 0 cM

zum Resistenzlocus kartierte (siehe Kapitel 3.5, Abb. 18). Ein weiterer Marker (ExxMxx_108) kartierte in einem Abstand von 0,2 cM. Ein Cluster von weiteren 13 Markern (ExxMxx_161, ExxMxx_216, ExxMxx_185, ExxMxx_147, ExxMxx_195, ExxMxx_168, ExxMxx_297, ExxMxx_159, ExxMxx_203, ExxMxx_160), darunter auch drei dominant ausgewertete SSR-Marker (HIGxx_148, HIGAx_168, HIGxx_192), kartierten in einem engen Abstand von 0,4 cM (Kapitel 3.5, Abb. 18).

Die 15 Marker liegen in einer geringen Distanz zum *R2*-Mehltauresistenzlocus und scheinen somit eng gekoppelt zu sein mit dem Resistenzgen. Eine Verifizierung und eine Validierung der Resistenzmarker im Zuchtmaterial muss noch folgen, um sie für eine effiziente markergestützte Selektion mehлтаuresistenter Hopfensämlinge einsetzen zu können.

4.4 cDNA-AFLP als Methode zur Darstellung differentieller Genexpression

Um ein Verständnis der Interaktion von Pflanzen mit Krankheitserregern zu erlangen, bieten biotechnologische Methoden eine gute Möglichkeit, schnell und gezielt neuartige Resistenzstrategien umzusetzen (Eichmann und Hüchelhoven, 2011). In dieser Arbeit wurde erstmals die Methode des cDNA-AFLP beim Hopfen angewandt, um differentielle Genexpression nach Inokulation mit dem Echten Mehltapilz *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* darzustellen und Unterschiede in der Genexpression zwischen resistenten und anfälligen Genotypen aufzuzeigen.

Bei dieser Methode wird im Wesentlichen ein Standard-AFLP-Protokoll (Vos et al. 1995) auf cDNA angewendet (Bachem et al., 1996). Da die PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern unter stringenten Bedingungen verlaufen, zeigen die Ergebnisse eine gute Reproduzierbarkeit mit weniger „Falschpositiven“ als beim mRNA *Differential Display* (Liang und Pardee, 1992). Die Vorteile der cDNA-AFLP gegenüber den auf Hybridisierung beruhenden *microarrays* ergeben sich dadurch, dass relativ kleine Mengen an RNA als Startmaterial ausreichen und theoretisch alle Gene sämtlicher Organismen, einschließlich selten exprimierter Gene, dargestellt werden können und eine Unterscheidung zwischen homologen Genen möglich ist. Weiterhin

können mit dieser Methode unterschiedliche Aspekte der Genexpression gleichzeitig beobachtet werden (in dieser Arbeit z. B. die Resistenzreaktion des Resistenzgens *RWH18* in Abhängigkeit von der Zeit und von verschiedenen Genotypen), wobei auch quantitative Unterschiede sichtbar werden. Auch lässt sich eine größere Anzahl von Proben, die von verschiedenen Zeitpunkten oder Genotypen stammen, parallel auf einem Gel untersuchen. Dadurch erhält man sowohl einen guten Überblick über den Verlauf der Genexpression zu unterschiedlichen Stadien der Wirt-Parasit-Interaktion als auch gute Vergleichsmöglichkeiten zwischen den Genotypen. Als Nachteile der cDNA-AFLP-Methode kann der relativ hohe Arbeitsaufwand mit vielen Einzelschritten angeführt werden und die Detektion von meist nur kurzen (bis 500 bp) cDNA-Fragmenten. Außerdem kann durch den Einsatz der Restriktionsenzyme nur 60-65 % des Transkriptoms abgedeckt werden (Bellin et al., 2009). Ein weiterer Nachteil liegt darin, dass die Anzahl der Gene, deren Expression mit cDNA-AFLP untersucht werden kann, deutlich unter der Anzahl von Genen liegt, die auf modernen Microarrays gebliottet sind.

„Next Generation Sequencing“ Plattformen wie z.B. 454 (Roche), Solexa (Illumina) und Solid (Applied Biosystems) ermöglichen die Sequenzierung ganzer Transkriptome. Diese Methoden, bei denen die Expressionsanalyse durch den Vergleich der Anzahl der einzelnen mRNAs in den zu untersuchenden Proben erfolgt, liefert in kurzer Zeit enorm große Menge an Daten. Zudem kann mit diesen Methoden neben einer Assoziation von Transkriptlevel und Phänotyp auch eine Assoziation von Polymorphismen und Phänotyp durchgeführt werden. Diese Auftragssequenzierungen erfordern aber enorme Geldsummen, Geräte-Ausstattung und sehr spezielles Know-How im Bereich der Bioinformatik, die im Rahmen dieser Arbeiten nicht realisierbar waren.

Da in dieser Arbeit zum ersten Mal eine Expressionsanalyse von Hopfen nach der Inokulation mit *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* durchgeführt wurde, war nicht bekannt, welcher Zeitpunkt nach der Inokulation am wichtigsten für die Expression resistenz- bzw. abwehrrelevanter Gene ist. Sehr gut untersucht ist die Gerste-Mehltau Interaktion. Neben Studien zur Entwicklung von *Blumeria graminis*, dem pilzlichen Erreger der Interaktion auf der Gerste (Hückelhoven, 2005), wurden auch schon zwei Abwehrstrategien, nämlich die Papillenbildung (Thordal-Christensen et al., 1999) und die Hypersensitive Reaktion (Hückelhoven und Kogel, 2003) von Gerste gegenüber *Blumeria graminis* gut untersucht.

Die Methode der cDNA-Technik zur Identifikation Pathogen-induzierter Gene wurde schon erfolgreich z.B. in der Gerste/Mehltau Interaktion eingesetzt (Eckey et al., 2004). Inzwischen gibt es bereits cDNA-Banken mit ESTs, die aus verschiedenen Versuchsansätzen der Gerste-Mehltau Interaktion hervorgegangen sind, die für weiterführende Untersuchungen des Transkriptoms, z. B. der *mlo*-vermittelten Resistenz, genutzt werden können (Zierold et al., 2005).

Die Zeitpunkte der Probenahme nach Inokulation mit dem Echten Mehltau wurden auf Grund von Studien von Godwin et al. (1987) mit der englischen Sorte Wye Target ausgewählt. Aus den Ergebnissen wurde abgeleitet, dass in einem Zeitraum zwischen 4 und 48 h nach Kontakt mit dem Pilz starke Veränderungen in der Genexpression stattfinden.

Bei der Identifizierung von Genen, die an der Resistenzreaktion gegenüber dem Echten Mehltau beteiligt sind, gelten grundsätzlich zwei Hypothesen. Zum einen gilt die Annahme, dass in einem resistenten Genotyp bestimmte Gene stärker oder schwächer exprimiert werden, als in einem anfälligen Genotyp („functional genomics“-Ansatz). Der zweite Ansatz beruht auf der Hypothese, dass ein resistenter Genotyp andere Allele für relevante Gene besitzt als ein anfälliger Genotyp („structural genomics“-Ansatz). Neben der differentiellen Genexpression können auch allelische Unterschiede, SNPs oder INDELs (Insertions/Deletions) in den Transkripten den Unterschied im Phänotyp verursachen.

In der vorliegenden Arbeit wurden in dem Screening mit Fluoreszenz-markierten Primern ca. 40 Banden pro Primerkombination (*EcoRI/MseI* und *PstI/MseI*) detektiert. Die insgesamt 93 Primerkombinationen erzeugten beim Screening der *in vitro*-Pflanzen ungefähr 3720 Genfragmente zwischen 75 und 700 bp. Ähnliche, wenn auch etwas höhere Zahlen findet man auch in anderen Arbeiten mit cDNA-AFLP (Bachem et al. 1996, Breyne et al. 2003). Bachem et al. (1996) testeten verschiedene Restriktionsenzym-Paarungen (*EcoRI*, *BamHI* und *PstI* als 6 bp cutter mit *TaqI* und *MseI* als 4 bp cutter) im cDNA-AFLP. Dabei generierten alle Enzymsysteme ähnlich viele Genfragmente (50-70 auswertbare Banden pro Primerkombination) und haben deshalb das gleiche Potential zur Darstellung differentieller Genexpression. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzym-Paarungen *EcoRI/MseI* und *PstI/MseI* lieferten mit durchschnittlich 40 Banden in beiden Enzymsystemen ein etwas

niedrigeres Niveau an Genfragmenten. Das kann darin begründet sein, dass sich die Hopfen-Mehltau Interaktion hauptsächlich in den Epidermiszellen und in nur wenigen darunterliegenden Zellschichten abspielt (Godwin et al., 1987). Dadurch ist der Anteil der Gesamt-RNA bzw. der TDFs, die mit der Mehltauabwehr assoziiert ist, geringer. Insgesamt konnte nur eine relativ geringe Anzahl an hochexprimierten differentiellen und resistenzrelevanten Transkripten zu den untersuchten Zeitpunkten bei den resistenten Wildhopfen WH18 nachgewiesen werden. Es bleibt zu überlegen, ob die von WH18-vermittelte Resistenz induziert wird oder ob sie konstitutiv exprimiert wird. Yang et al. (1997) unterschieden zwischen konstitutiv exprimierten und induzierten Resistenzmechanismen. Die konstitutive Expression hydrolytischer Enzyme kann im Gegensatz zu einer pathogen-induzierten Expression bereits in sehr frühen Stadien der Infektion zur Freisetzung von Elicitoren führen und dadurch eine frühzeitige Pathogenabwehr induzieren.

Die cDNA-AFLP-Marker wurden in der vorliegenden Arbeit qualitativ ausgewertet, d.h. Vorhanden/ Nicht-Vorhanden (striker 0/1) Polymorphismus.

Die Expressionsstudien wurden mit der SMART-Methode durchgeführt. Mit dieser Methode können häufig und selten vorkommende Transkripte repräsentativ vervielfältigt werden, wodurch die Komplexität der anfänglichen mRNA-Population beibehalten wird (Endege et al., 1999; Zhumabayeva et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden alle cDNA-AFLP-Fragmente analysiert, deren Expression sich nach Inokulation mit *Podosphaera macularis ssp. humuli* in den resistenten Genotypen im Vergleich zu anfälligen Genotypen unterschied. Da vermutet wird, dass die Resistenzmechanismen und die Struktur der einzelnen Resistenzgene gegenüber verschiedenen Pathogenen innerhalb der verschiedenen Pflanzenarten ziemlich ähnlich funktionieren (Takken and Joosten, 2000; Young, 2000), wurden die TDFs auf Homologien zu anderen Resistenzgenen und zur Aufklärung der Genfunktion in EST-Datenbanken geprüft.

4.4.1 Darstellung pilzlicher Gene mittels cDNA-AFLP nach Inokulation von Hopfenblättern mit *Podosphaera macularis* ssp. *humuli*

Im cDNA-AFLP wurden Banden detektiert, die ausschließlich nach Inokulation mit *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* auftraten. Bei diesen Banden kann es sich entweder um Fragmente pilzlicher Gene oder nach Kontakt mit Mehltau induzierter Hopfengene handeln. Nach der BLAST-Analyse wurden in 12 % dieser sequenzierten Fragmente Homologien zu pilzlichen Genen identifiziert. Mit dem Ziel, Gene des obligat biotrophen Oomyceten *Peronospora parasitica* bei *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren, führte van der Biezen et al. (2000) ein cDNA-AFLP mit infizierten *Arabidopsis* Blättern durch. Nur zehn von 23 sequenzierten TDFs waren pilzlichen Ursprungs. Als Ursache für die geringe Anzahl an detektierten Genen pilzlichen Ursprungs vermuteten die Autoren, dass seltener vorkommende pilzliche Transkripte durch die große Menge an pflanzlicher mRNA verdrängt werden. Das könnte auch für diese Arbeit zutreffen, wobei dieses Projekt nicht die Isolierung von pilzlichen Genen zum Ziel hatte.

4.4.2 Als cDNA-AFLP exprimierte Gene von Hopfen nach Inokulation mit *Podosphaera macularis* ssp. *humuli*

Sobald die Pflanze ein angreifendes Pathogen erkennt, werden verschiedene Signalwege aktiviert, die zu einer veränderten Genexpression und so zur Initiation von Abwehrreaktionen führen (Scheel, 1998). Elicitoren, die als biochemische Signale sowohl an der Zelloberfläche als auch innerhalb der Zellen der Pflanze fungieren, regen dabei die Pathogenabwehr über eine Reihe von Signalkaskaden an. Zu den Elicitoren, die auch als „Pathogen-associated molecular pattern“ (PAMP) bezeichnet werden, gehören Makromoleküle aus der pilzlichen Zellwand und vom Pathogen sekretierte Moleküle wie z. B. Oligosaccharide, (Glyco-) Proteine, Peptide oder Fettsäuren (Vidhyasekaran, 1997; Nürnberger and Brunner, 2002; Schulze-Lefert and Panstruga, 2003). Potentielle Elicitoren aus *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* sind bisher jedoch noch nicht bekannt.

Die *in vitro*-Kultivierung von Hopfen war insgesamt relativ schwierig, so dass nicht genügend Pflanzen regeneriert werden konnten, um bei jedem Probenahmezeitpunkt eine unbehandelte Kontrolle mit zu untersuchen. Diese Kontrolle stellt aber einen wesentlichen Punkt bei der Auswertung der exprimierten TDFs dar. Zu jedem

Probenahmezeitpunkt sind sehr viele verschiedene Gene exprimiert. Mit Hilfe der unbehandelten Kontrolle zu jedem Zeitpunkt können nun diejenigen Gene identifiziert werden, die unmittelbar mit der Reaktion der Pflanze auf den Echten Mehltau in Zusammenhang stehen. Diese entscheidende Verbesserung beim Versuchsaufbau konnte im zweiten Versuch mit den vegetativ über Wurzelfeuchser vermehrten Gewächshaus-Pflanzen realisiert werden. In diesem Versuchsansatz wurden aber keine anfälligen sondern nur resistente Individuen mit Mehltau beimpft. In weiterführenden Versuchen sollten anfällige Individuen wieder hinzugenommen werden. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeiten stand kein virulentes Isolat für die WH18-Resistenz zur Verfügung. Unterschiede im Expressionsmuster nach der Beimpfung mit einem avirulentem und einem virulenten Isolat bei resistenten Pflanzen wären aber bei der Untersuchung des Resistenzmechanismus sehr interessant gewesen. Dieser verbesserte Versuchsansatz konnte bei nachfolgenden Expressionsstudien mit Wye Target (R_2) umgesetzt werden, da für die R_2 -Resistenz sowohl ein virulentes (E10; $v1$, $v2$, $v5$ Virulenztyp) als auch ein avirulenten Isolat (BU10; $v3$, $v4$, $v6$, und vB Virulenztyp) zur Verfügung stand.

558 der im cDNA-AFLP dargestellten Transkriptfragmente wurden nach Inokulation mit *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* differentiell exprimiert, das sind etwa 15 % der insgesamt beobachteten Fragmente (ca. 3720). In verschiedenen Arbeiten variierte der Prozentsatz differentiell regulierter Gene nach Pathogenbefall zwischen 1 und 16 % der untersuchten Transkripte. Collinge et al. (2002) schätzten, dass ca. 1000 Gene in Pflanzen nach Pathogenbefall differentiell exprimiert werden.

Die absolute Anzahl der differentiell exprimierten Gene weicht aber von dieser Zahl ab. Gene mit großer Basenlänge können z. B. mehrmals durch die eingesetzten Restriktionsenzyme geschnitten werden und auch eine Redundanz durch ungenaue Primeranlagerungen führen dazu, dass mehrere Fragmente des gleichen Gens dargestellt werden. Auf der anderen Seite werden nicht alle Gene von den Restriktionsenzymen geschnitten, wodurch die Anzahl der regulierten Gene unterschätzt wird.

Auffallend wenige Banden (2 % in resistenten bzw. 1 % in anfälligen Individuen im Versuch 1, 3 % im Versuch 2) wurden in der vorliegenden Arbeit beobachtet, deren Intensität nach der Inokulation mit *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* sichtbar schwächer wurde. Insgesamt wurden deutlich mehr Gene hoch (7 % in resistenten und 4 % in anfälligen Individuen im Versuch 1, 6 % im Versuch 2) als herunter reguliert. Dies

entspricht aber auch anderen Arbeiten, bei denen in vergleichbaren Pathogen-Pflanzen-Interaktionen auch jeweils mehr Gene induziert als supprimiert wurden (Durrant et al., 2000; Ditt et al., 2001, Zierold et al., 2005; Müllenborn, 2009). Dies könnte in der Methode der cDNA-AFLP begründet sein. Die schwächer exprimierten cDNA-Fragmente könnten von anderen cDNA-Fragmenten überlagert worden sein, zumal häufig mehrere Fragmente der gleichen Größe im Gel übereinander liefen.

Die primäre Ebene der Genexpressionskontrolle ist die Transkription. Dennoch wird die Proteinakkumulation und Proteinaktivität nicht nur durch die mRNA-Menge bestimmt, sondern auch post-translationale Modifikationen spielen eine wesentliche Rolle (Gygi et al., 1999). Dadurch kann die in dieser Arbeit untersuchte mRNA-Akkumulation in den Hopfenblättern nach Inokulation mit Mehltreupilz nur Hinweise auf eine mögliche Funktion des entsprechenden Proteins in der Wirt-Pathogen Interaktion geben.

Oft werden zwar in kompatiblen bzw. inkompatiblen Interaktionen die gleichen Gene angeschaltet, allerdings können diese in der Schnelligkeit, Dauer und die Intensität der Induktion in variieren. Durrant et al. (2000) gehen ebenfalls davon aus, dass der entscheidende Effekt durch Unterschiede in Dauer und Stärke der Aktivierung der gleichen Signalkomponenten bzw. der gleichen Geninduktion resultiert.

Im Folgenden wird eine Auswahl der durch Inokulation mit *Podosphaera macularis* ssp. *humulus* differentiell exprimierten Genfragmente diskutiert, bei denen es aufgrund von Sequenzähnlichkeiten mit Genen, die bei anderen Pflanzen mit Resistenzreaktionen im Zusammenhang stehen, Hinweise gibt, dass sie an der Abwehr von Hopfen gegenüber *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* beteiligt sein könnten.

4.4.2.1 Enzyme des antioxidativen Systems

Durch eine Pilzattacke werden neben den im „oxidativ burst“ gebildeten transienten Reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI, *reactive oxygen intermediates*) auch Enzyme des antioxidativen Systems angeschaltet (Levine et al., 1994; Hüchelhoven and Kogel, 2003). Das in dieser Arbeit identifizierte Transkript einer Peroxidase (TDF_19) könnte für Antioxidantien kodieren. In höheren Pflanzen existiert eine sehr hohe Anzahl von Isoformen dieser Enzyme. Die Hauptfunktion dieser Enzyme ist ihre Beteiligung an der Polymerisierung und Depolymerisierung von Zellwandkomponenten, der Ligninsynthese und der Quervernetzung von Suberinmonomeren zur Verholzung bzw.

Korkbildung in und an den Zellwänden (Bernards et al., 2004; Li et al., 2003; Quiroga et al., 2000). Des Weiteren sind Peroxidasen in den Chloroplasten für die Entgiftung von Wasserstoffperoxid von besonderer Bedeutung, in den Peroxisomen hingegen übernimmt Katalase den Abbau vom schädlichen H₂O₂ (Willekens et al., 1997).

Bei dem cDNA-Fragment TDF_19 handelt es sich um einen Precursor einer Peroxidase. Die homologe Sequenz stammt aus einer Arbeit, in der es um die Charakterisierung von Genen ging, die an der Abwehr in Tomaten-Pflanzen nach einer Viroid-Infektion beteiligt waren. TDF_19 wurde in den resistenten Genotypen der *in vitro*-Pflanzen 6 hpi hochreguliert und ab 22 hpi herunter reguliert. Bei den anfälligen Genotypen wurde dieses Fragment nicht gebildet. Neben der Polymerisierungsreaktion in der Zellwand können Peroxidasen auch noch bei anderen Biosynthesen von Bedeutung sein. So sollen sie z. B. die letzte Stufe der Hordatinsynthese katalysieren (Stoessl, 1967). Bei Hordatinen handelt es sich um Dimere von Hydroxyzimtsäureamiden, die antifungale Wirkung haben und auch nach Inokulation mit *Bgh* in der Gerste akkumulierten (Smith und Best, 1978).

4.4.2.2 Glykoproteine

TDF_031 wies eine Homologie zu einem Glykoprotein auf. Glykoproteine können zahlreiche Funktionen im pflanzlichen Organismus erfüllen. Sie dienen als strukturelle Bestandteile (Strukturproteine) von Zellmembranen, als Gleitmittel und zur Zellinteraktion. Glykoproteine sind aber auch bei der Infektion von Pflanzen mit Viren und Pilzen verantwortlich (Waffenschmidt and Jaenicke, 1991). Hydroxyprolin-reiche Glykoproteine (HRGPs) gehören neben Glycin-reichen Proteinen und Cystein-reichen Thioneinen zu den durch Abwehr induzierten Proteinen (Waffenschmidt and Jaenicke, 1991). Die Pathogenabwehrreaktion wird durch die Bindung dieser Verbindungen an Rezeptorproteine ausgelöst (Kogel et al., 1988; Marticke et al., 1998).

4.4.2.3 An Stressreaktionen beteiligte Gene

Das Transkript TDF_005 hatte Ähnlichkeit mit der Sequenz der S-Adenosylmethionine Decarboxylase. S-Adenosylmethionine Decarboxylase ist das Substrat für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Biosynthese der Polyamine Spermidin und Spermin. Polyamine sind ubiquitär vorkommende Stoffwechselprodukte und sind

essentielle Faktoren bei der Zellproliferation und Zelldifferenzierung und haben möglicherweise Hormon-Eigenschaften. S-Adenosylmethionine Decarboxylase wurde auch bei Apfel (Hao et al., 2005) und Tabak (Soo et al., 2006) in Zusammenhang mit Stressreaktionen induziert. Weitere sieben cDNA-Fragmente (TDF_003, TDF_021, TDF_023, TDF_027, TDF_038, TDF_044 und TDF_047) zeigten Homologien zu ebenfalls durch abiotischen Stress induzierten ESTs in verschiedenen Pflanzenarten. Viele verschiedene Gene sind an der Stressreaktion der Pflanzen beteiligt. So werden z. B. Enzyme des Phenylpropanoidstoffwechsel durch Pathogene, aber auch durch UV-Licht, Verwundung, niedrige Temperaturen und Nährstoffmangel induziert (Dixon und Paiva, 1995). Im Pathosystem Gerste-Echter Mehltau wurden nach Applikation chemischer Resistenzinduktoren Gene induziert wie die Lipoxygenase und Thionin (Beßer et al., 2000). Weiter konnten Beßer et al. (2000) Homologien zu sauren Phosphatasen, zu Ca^{2+} -bindenden *single EFhand*-Proteinen, zu Serin-Proteinaseinhibitoren und zu Apyrasen identifizieren.

4.4.2.4 An Abwehrreaktionen gegenüber verschiedenen Pilzen beteiligte Gene

Einige cDNA-AFLP-Fragmente (TDF_004, TDF_007, TDF_014 und TDF_037) zeigten Ähnlichkeiten zu Gensequenzen, die ebenfalls nach Abwehrreaktionen gegenüber verschiedenen Pilzen in unterschiedlichen Pflanzenarten detektiert wurden. Allerdings konnten diesen ESTs keinen bereits bekannten Funktionen zugeordnet werden. Bei Pflanzen werden nach der Erkennung des Pathogens eine Reihe verschiedener Abwehrreaktionen ausgelöst, die in den verschiedenen Wirt-Pathogensystemen abhängig von der Lebensweise des Pathogens teilweise ähnlich ablaufen (Dangl und Jones, 2001; Nürnberger und Scheel, 2001). Sie können aber auch für das Pathosystem spezifische Merkmale aufweisen. Ein Teil der Abwehrreaktionen wird ausgelöst durch die transkriptionelle Aktivierung von Genen, die für Enzyme der Biosynthese antimikrobieller Phytoalexine, für „*pathogenesis-related proteins*“ (PR-Proteine) oder für lytische Enzyme wie Chitinasen, Glukanasen oder Proteasen, kodieren (Kombrink und Somssich, 1995; Scheel, 1998; Hückelhoven, 2007). Weitere Abwehrmechanismen stellen die Verstärkung der Zellwände durch oxidative Quervernetzung und Einlagerung von Kallose und Lignin dar (Bolwell et al., 2002;

Hückelhoven, 2007). Auch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) (Hückelhoven und Kogel, 2003; Hückelhoven, 2007), die Akkumulation von Stickstoffmonoxid (NO) (Wendehenne et al., 2004) und die hypersensitive Reaktion (HR) sind typische Abwehrreaktionen der Pflanze (Hammond-Kosack und Jones, 1996; Lam et al., 2001). Im mit am besten untersuchten Gerste-Mehltaupilz Pathosystem konnte Zierold et al. (2005) in seinen Transkriptomanalysen Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen u.a. aus den Gruppen des Primär- und Sekundärmetabolismus, der Photosynthese, der Signalkomponenten, der Transkription, der Translation und der ROS detektieren. Eckey et al. (2004) identifizierten Pathogen-induzierte Gene der Gerste, die zu einem großen Teil für Proteine aus den Bereichen Phenylpropanoidstoffwechsel, Redox-Regulation und Signaltransduktion kodieren. Auch eine MAP-Kinase konnte identifiziert werden, die u.a. an der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und des programmierten Zelltods beteiligt sind (Eckey et al., 2004). Obwohl in dieser Arbeit keine entsprechenden TDFs identifiziert werden konnten, ist dennoch davon auszugehen, dass auch im Pathosystem Hopfen-Echter Mehltau ähnliche Abwehrmechanismen eine Rolle bei der Pathogenabwehr spielen.

4.5 Ausblick

Im Gegensatz zu anderen Pathosystemen, wie z. B. das Gerste-Mehltaupilz Pathosystem, ist über die Hopfen-Mehltau-Interaktion noch relativ wenig erforscht. Das gilt insbesondere für die in dieser Arbeit untersuchte Interaktion des Wildhopfens aus der Eifel (WH18) mit dem Echten Mehltaupilz. Hückelhoven (2011) geht allerdings davon aus, dass, obwohl die verschiedenen Mehltauarten hochspezialisiert sind, allen Arten auch ein gemeinsames Kernbesteck besitzen, um die Pflanzen erfolgreich zu befallen. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass das *MLO*-Gen in Tomaten, Erbsen und Gerste auch im Hopfen und vermutlich in weiteren Pflanzen, die von Mehltau befallen werden, den Pilz bei seiner Infektion unterstützt (Hückelhoven, 2011). Consonni et al. (2006) konnten die *mlo*-bedingte Mehtauresistenz der Gerste erstmals auch in der zweikeimblättrigen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* erzeugen. Die durch den Wegfall des *MLO*-Proteins bedingte Immunität könnte möglicherweise auch in jeder anderen höheren Pflanzenspezies, so z. B. auch im Hopfen, generiert werden. Erste

aktuelle Forschungen (Oberhollenzer et al., 2011, Oberhollenzer und Seigner, 2012) beschäftigen sich mit der Interaktion Hopfen-Hopfenmehltau, insbesondere mit den verschiedenen Wildhopfen aus der ganzen Welt, welche als neue Resistenzträger für die Züchtung dienen sollen. Hierbei soll sowohl eine zeitliche als auch räumliche Darstellung der Abwehrreaktion erfolgen. In mikroskopischen Studien konnten bereits unterschiedlichen Resistenzmechanismen der verschiedenen Wildhopfen, wie Zelltod oder Zellwandverstärkungen erfasst werden (Oberhollenzer et al., 2011, Oberhollenzer und Seigner, 2012). Erkenntnisse aus diesen Studien können in der Kreuzungszüchtung dazu genutzt werden, um gezielt verschiedene, sich in ihrer Wirkung ergänzende Resistenzmechanismen, zu kombinieren.

In parallel zu dieser Arbeit laufenden Versuchen mit der resistenten Sorte Wye Target wurden nach Mehltau-Kontakt Fragmente identifiziert, die eine Sequenz-Ähnlichkeit zu einer Serin-hydroxymethyltransferase aufwies. Diese Serin-hydroxymethyltransferase wurde bei der Gerste mit *mlo5* Resistenz in den Epidermiszellen 6 und 24 h nach Inokulation mit *Blumeria graminis* identifiziert (Seigner et al., 2009). Bei *Arabidopsis* steht diese Enzymaktivität in Zusammenhang mit der Photorespiration und scheint entscheidend zu sein bei der Beschränkung der Zellschädigung beim Pathogen-induzierten Zelltod (Moreno et al., 2005).

Die bisherigen Ergebnisse können in verschiedenen methodischen Ansätzen weiterverarbeitet werden.

In einem ersten Ansatz wurde versucht, ausgehend von einem gefundenen, mit der Abwehr korrelierenden TDF, über Pyrosequenzierung sogenannte SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) zu identifizieren, um Selektionsmarker auf genomischer Ebene für die Mehltaresistenz zu entwickeln. Dabei konnte ein detektierter Basenaustausch bei R_2 -resistenten Eltern und wenigen Individuen bei der Untersuchung einer größeren Anzahl resistenter Nachkommen nicht mehr bestätigt werden. Bei den anderen gefundenen TDFs besteht aber die Möglichkeit, nach möglichen SNPs zu suchen. Die wissenschaftliche Bedeutung der SNPs beruht auf ihrem häufigen Auftreten und der hohen Variabilität im Genom. Ein weiterer Vorteil liegt in ihrer sehr schnellen und einfachen Bestimmung.

Des Weiteren können die in dieser Arbeit generierten Transkriptionsprofile mit Hilfe einer computergestützten quantitativen Analyse, wie z.B. der quantitativen Real-time PCR, validiert werden. Bei dieser Methode wird die Intensität der Banden und damit die Menge an mRNA gemessen.

Die Erstellung einer EST-Datenbank stellt eine nützliche Informationsquelle für viele verschiedene Pflanzenarten dar. Insbesondere für Nicht-Modellpflanzen, deren Genom noch nicht sequenziert ist, wie z. B. dem Hopfen, sind EST-Datenbanken von großer Bedeutung. So könnte in einem nächsten Schritt eine cDNA-Bank aus den identifizierten ESTs erstellt werden, mit der die bereits existierenden Datenbanken von Hopfen (u.a. Novak et al., 2005) ergänzt werden könnten.

Ein zukünftiges Ziel in der Resistenzzüchtung könnte die Erstellung transgener Hopfenpflanzen sein, die durch Überexpression oder Repression bestimmter Gene resistenter gegenüber Krankheitserregern sind. Aktuell werden verschiedene gentechnische Verfahren, wie dem transienten Assay eingesetzt, um die spezifische Wirkung von verschiedenen Kandidatengenen auf die Resistenz von Hopfen gegenüber *Podospaera macularis* ssp. *humuli* zu überprüfen (Oberhollenzer et al., 2011, Oberhollenzer und Seigner, 2012).

Das Aktivitätsmuster der TDFs, die auf Grund ihrer Expressions-Kinetik bei der Abwehrreaktion beteiligt sein könnten und Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Resistenzgenen zeigten, könnten in einer semiquantitativen PCR genauer untersucht werden. Eine stärkere oder schwächere Expression nach Mehлтаubefall kann auf eine Funktion in der Interaktion Hopfen-Hopfenmehltau hinweisen.

Weitere Methoden, mit der hier gefundenen TDFs weiter erforscht werden könnten, basieren auf der Hemmung der Genexpression bestimmter Gene oder Genfamilien durch den Einsatz von „small interfering RNA“ (siRNA). Das Wirkprinzip beruht auf dem Anti-Virus-Abwehr-Prinzip der pflanzlichen Zellen (Sidamed und Wilkie, 2010).

Zuletzt ist die Methode des Gentransfers für eine gezielte Übertragung von Resistenzgenen zu nennen. Erste Arbeiten zur Verbesserung der Pilzresistenz über die Insertion von Resistenzgenen wurden bereits durchgeführt (Miehle und Seigner, 2007).

In den Versuchen wurden vermutete Resistenzgene aus Pflanzen und Bodenbakterien isoliert, in Vektoren kloniert und anschließend in den Hopfen übertragen. In einem Blatttest konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Echten Mehltau nachgewiesen werden (Miehle and Seigner, 2007). Unter Gewächshausbedingungen war diese Resistenz aber nicht wirksam.

5 Zusammenfassung

Da alle bisher bekannten Resistenzgene bei Hopfen von virulenten Mehлтаustämmen bereits durchbrochen sind, wurden neue Resistenzquellen aus vielversprechenden Wildhopfen (drei männliche und zwei weibliche Sämlinge von WH18 aus Deutschland und ein Sämling von dem aus Japan stammenden Wildhopfen JAP-C845) in das Hüller Zuchtmaterial eingekreuzt, um die genetische Basis für die Mehltaresistenz vor allem bei den Aromasorten zu verbreitern und letztendlich neue Sorten mit neuen Resistenzmechanismen zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Vererbung von zwei neuen Mehltaresistenzgenen in verschiedenen Nachkommenschaften untersucht werden und für diese Resistenzen DNA-Marker entwickelt werden.

Für das bis 2008 voll wirksame Resistenzgen, das in dem aus der Eifel stammenden Wildhopfen WH18 detektiert wurde, wurden zwei AFLP-Marker (PxxMxx_292 und PxxMxx_290) mit einem genetischen Abstand von jeweils 2,2 cM vom R_{WH18} -Locus identifiziert. Nachkommen der spaltenden Population mit diesem Marker wiesen keinerlei Spuren von Mehltau auf ihren Blättern auf. Diese eng gekoppelten molekularen Marker stellen einen guten Ausgangspunkt für die Lokalisierung dieses Gens und zur markergestützten Selektion dar. Die universelle Einsetzbarkeit des R_{WH18} -Resistenzmarkers wurde durch die Verifizierung des Markers in allen R_{WH18} -tragenden Zuchtstämmen nachgewiesen. Für das Resistenzgen JAP-C845, das eine neue Resistenz aus einem japanischen Wildhopfen beschreibt, konnte ein Marker (ExxMxx_423) identifiziert werden. Die aus den Rekombinationsraten ermittelte genetische Distanz des Markers zu dem Resistenzlocus betrug 0 cM, d.h. der Marker scheint auf dem Resistenzlocus zu liegen. Ein weiterer AFLP-Marker konnte in einem Abstand von 5 cM und ein Mikrosatelliten-Marker im Abstand von 6 cM kartiert werden. Auch diese eng gekoppelten molekularen Marker eignen sich sehr gut für eine markergestützte Selektion. In zwei zusätzlich erstellten Kartierungspopulationen konnten jeweils zwei bis dahin in Deutschland noch voll wirksame Resistenzgene R_2 (aus der englischen Sorte Wye Target) und R_{WH18} (aus dem Wildhopfen WH18) bzw. $R_{JAP-C845}$ (aus dem japanischen Wildhopfen) und R_{WH18} (aus dem Wildhopfen WH18) erfolgreich in einem Genotyp pyramidiert werden. Mit der Erweiterung der genetischen Basis der

Mehltauresistenz durch Introgression von neuen Resistenzgenen aus Wildmaterial und das sogenannte „Pyramiding“ von Resistenzgenen, wurden wichtige züchterische Möglichkeiten genutzt, um neue Hopfensorten zu entwickeln, die gegenüber dem Pathogen *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* auch in Zukunft ein gutes Resistenzverhalten aufweisen.

Für die ersten Expressionsstudien der bei der Interaktion Hopfen/Echter Mehltau möglicherweise beteiligten Gene wurde in dieser Arbeit die Methodik der cDNA-AFLP-Technik angewandt. Um diejenigen Transkripte zu charakterisieren, die nach Kontakt mit dem Pathogen *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* differentiell exprimiert wurden, wurden Blätter von Individuen, die die R_{WH18} -Resistenz tragen, im Vergleich zu anfälligen Individuen (ohne R_{WH18} -Resistenz) mit *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* beimpft und zu drei bzw. fünf Zeitpunkten innerhalb der ersten sieben Tage nach der Inokulation untersucht. Es konnten 33 unterschiedliche cDNA-Fragmente (TDFs) identifiziert werden, die nach der Inokulation mit *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* in resistenten Individuen im Vergleich zu den anfälligen Individuen bzw. den wasserbehandelten Kontrollen ein unterschiedliches Expressionsmuster zeigten. Ein interessantes Gen, das nach der Infektion mit *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* in den resistenten Pflanzen hochreguliert wurde, zeigt eine Homologie zu einem Precursor einer Peroxidase. Peroxidasen spielen bei Polymerisierungsreaktionen in der Zellwand und auch bei anderen Biosynthesen eine große Bedeutung. Weitere Homologien konnten zu einem Glycoprotein und zu einer S-Adenosylmethionine Decarboxylase identifiziert werden, wobei erstere bei der Infektion von Pflanzen mit Pilzen eine Rolle spielt und im Fall von der S-Adenosylmethionine Decarboxylase bei Apfel auch in Zusammenhang mit Stressreaktionen induziert wurde. Mit Hilfe der cDNA-Methode konnten erstmals in der Interaktion Hopfen/Echter Mehltau differentiell exprimierte Transkripte in resistenten Individuen detektiert und Homologien zu bekannten Genen identifiziert werden, die möglicherweise an der Ausprägung der R_{WH18} -vermittelten Resistenz beteiligt sind.

Die Ergebnisse des Projektes sind geistiges Eigentum des EHRC (European Hop Research Council), die dieses Projekt finanziell gefördert haben. Aus diesem Grund sind entscheidende Marker in dieser veröffentlichten Arbeit nur in codierter Form dargestellt.

6 Summary

Since almost all known monogenic resistances utilized in breeding of hops have already been overcome by virulent powdery mildew strains, new sources of resistance were needed. Several new powdery mildew resistant wild hops (three male and two female WH18 derived seedlings, with origin in Germany which has been fully resistant until 2008 in Germany and a seedling derived from a wild hop JAP-C845 with origin in Japan) have been used as crossing partners in the Hüll germplasm to broaden the genetic base for resistance to powdery mildew, especially in the aroma sector.

In the present study, the inheritance of two new powdery mildew resistance genes should be studied in different progenies and closely linked markers should be developed for these resistances.

Applying the AFLP- (amplified fragment length polymorphism) technique and using SSRs in combination with the bulk segregant analysis, two tightly linked AFLP markers (PxxMxx_292 and PxxMxx_290) flanking the resistance locus R_{WH18} at a genetic distance of 2.2 cM were identified. The progeny of the segregating population carrying these markers showed no trace of powdery mildew infection on their leaves. These closely linked molecular markers provide a good starting point for the localization of this resistance gene and for marker-assisted selection. The universal utilization of the R_{WH18} -resistance marker was proved by verifying the marker in all R_{WH18} -based breeding lines. For the resistance gene $R_{JAP-C845}$, one marker (ExxMxx_423) was identified at a genetic distance of 0 cM to the resistance locus. Additional markers (AFLP and SSR) could be mapped at a distance of 5 to 6 cM. These closely linked molecular markers are well suited for marker-assisted selection. Double resistant individuals carrying two different resistance genes are highly promising in showing a more durable resistance due to the increased gene barrier towards invading powdery mildew strains. Therefore, two additional mapping populations were developed with double resistances. One mapping population combined the resistance gene R_2 (from the English cultivar Wye Target) and the R_{WH18} gene (from the German wild hop WH18), the second population brought together the R_{WH18} resistance and $R_{JAP-C845}$ (from the Japanese wild hop JAP-C845) resistance. The pyramiding of two different resistance genes in some new seedlings was successfully done. The widening of the genetic basis of the powdery

mildew resistance through introgression of new resistance genes from wild species and the so-called “pyramiding” of resistance genes are two very effective breeding strategies to develop new hop varieties which can efficiently control the pathogen *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* also in the future.

First expression studies of those genes possibly involved in the interaction between hop/powdery mildew were conducted using the cDNA-AFLP technique. Based on the assumption that the majority of genes involved in the defense response are newly activated after contact with the pathogen, cDNA-AFLP based transcript profiles of resistant (*R_{WH18}*) and susceptible hops have been analyzed after contact with powdery mildew to identify these genes. In these studies leaves were harvested three to five times within seven days after contact with powdery mildew spores. So far 33 differentially expressed TDFs (transcript derived fragments) were identified during the resistance reaction of WH18 towards powdery mildew. Sequence homologies of these TDFs to genes involved in the resistance reactions in other crops to various fungi could be identified (f. e. glycoprotein). One gene which was up-regulated in the resistant reaction revealed sequence similarity with a peroxidase precursor. Peroxidases are important in polymerization reactions of the cell wall as well as in different biosynthesis pathways. Another TDF showed homology to S-Adenosylmethionine decarboxylase from apple which was associated with stress reactions. cDNA-AFLPs derived from active, coding genome regions are highly informative and reliable. In this study for the first time we were able to identify differently expressed TDFs in resistant individuals after inoculation with *Podosphaera macularis* ssp. *humuli* which may be involved in the *R_{WH18}* based resistance reaction. Putative function of the TDFs in defense pathways could be deduced.

Results of this project are the intellectual property of EHRC (European Hop Research Council) as funding institution and thus, crucial markers are only provided in this published work in coded form.

7 Literatur

- Ainsworth C., 2000. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Ann. Bot.* 86: 211-221.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Anderson J.A., Churchill G.A., Autrique J.E., Tanksley S.D. und Sorrels M.E., 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 181-186.
- Bachem C. W. B., Van der Hoeven R. S., De Bruijn S. M., Vreugdenhil D., Zabeau M., Visser R. G. F., 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal* 9: 745-753.
- Bai G.H., Shaner G., Ohm H., 2000. Inheritance of resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1-8.
- Barth-Bericht 2010/2011. <http://www.barthhaasgroup.com>. und http://www.barthhaasgroup.com/images/pdfs/barthreport_20102011_german.pdf
- Bellin D., Ferrarini A., Chimento A., Kaiser O., Levenkova N., Bouffard P., Delledonne M., 2009. Combining next-generation pyrosequencing with microarray for large scale expression analysis in non-model species. *BMC Genomics* 10: 555.
- Bernards M.A., Summerhurst D.K., Razem F.A., 2004. Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: The suberin connection. *Phytochemistry Rev.* 3: 113-126.
- Beßer K., Jarosch B., Langen G. and Kogel K.H., 2000. Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Mol. Plant Pathol.* 1(5), 277-286.
- Biendl M., 2005/2006. *Hopfenrundschau International*: 22-27.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C. und Minibayeva, F., 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* 53, 1367-1376.
- Boskovic J., Boskovic M., Babovic M., Jerkovic Z., and Pesic V.. 2001. Pyramiding strategy for durable resistance to wheat leaf rust pathogen. pp. 337-343. *In: Bedö, Z. and L Láng. Wheat in a Global Environment. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.*
- Bradshaw H.D.Jr. and Stettler R.F., 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. II. Segregation distortion due to genetic load. *Theor. Appl. Genet.* 89: 551-558.

Brady J.L., Scott N.S. und Thomas M.R., 1996. DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS). *Euphytica* 91: 277-184.

Breyne P., Dreesen R., Cannoot B., Rombaut D., Vandepoele K., Rombauts S., Vanderhaeghen R., Inze D. und Zabeau M., 2003. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Molecular Genetics and Genomics* 269: 173-179.

Brugmans B., van der Hulst R.G.M., Visser R.G.F., Lindhout P., van Eck H.J., 2003. A new and versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 31, No. 10 e55.

Buntjer J.B., Otsen M., 2000. Cross Checker provides computer-assisted marker interpretation. *J Agric Genomics*. <http://www.ncgr.org/research/jag/papers99/paper599/indexp599.html>.

Castiglioni P., Ajmone-Marsan P., van Wijk R., Motto M., 1999. AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. *Theor. Appl. Genet.* 99: 425-431.

Cerenak A., Jakse J., Javornic B., 2004. Identification and differentiation of hop varieties using simple sequence repeat markers. *J. Am. Soc. Chem.* 62(1): 1-7.

Cerenak A., Satovic Z., Javornik B., 2006. Genetic mapping of hop (*Humulus lupulus* L.) applied to the detection of QTLs for alpha-acid content. *Genome* 49: 485-494.

Cerenak A., Kralj D., Javornik B., 2009. Compounds of essential oils as markers of hop resistance (*Humulus lupulus*) to powdery mildew (*Podosphaera macularis*). *Acta agriculturae Slovenica*, 93-3: 267-273.

Cervera M.-T., Storme V., Ivens B., Gusmao J., Liu B.H., Hostyn V., van Slycken J., van Montagu M. and Boerjan W., 2001. Dense Genetic Linkage Maps of Three Populus Species (*Populus deltoids*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) Based on AFLP and Microsatellite Markers. *Genetics* 158: 787-809.

Collinge D.B., Gregersen P.L., Thordal-Christensen H., 2002. The nature and role of defence response genes in cereals. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. R. R. Belanger, W. R. Bushnell. St. Paul, Minnesota, USA, APS Press. Chapter 10: 146-160.

Consonni C., Humphry M.E., Hartmann H.A., Livaja M., Durner J., Westphal L., Vogel J., Lipka V., Kemmerling B., Schulze-Lefert P., Sommerville S.C. & Panstruga R., 2006. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat. Gen.* 38(6):716-20.

Cooberg, H.J. und Gehde, J. (2011): Hopfenrundschau (7), 186.

Dalbo M.A., Ye G.N., Weeden N.F., Steinkellner H., Sefc K.M. and Reisch B.I., 2000. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome* 43: 333-340.

- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- Darby P. und Gunn R.E., 1987. Report on a joint programme of research and development work on hops carried out by the Institute of Horticultural Research and the Agricultural Development and Advisory Service (ed. R.E. Gunn).
- Darby P., Godwin J.R. und Mansfield J.W., 1989. The assessment of partial resistance to powdery mildew disease in hops. *Plant Pathology* 38: 219-225.
- Darby P., 1998 a. UK Research Offer Advice on Hop Powdery mildew. *Brewers Digest* 2: 24-26.
- Darby P., 1998 b. The Symptoms and Biology of Hop Powdery Mildew. In: Hop Powdery Mildew Electronic Symposium, presentation from the 1998 US Hop Industry Joint meeting, Yakima, Washington, January 19-23, <http://www.scisoc.org/darby.htm>.
- Desprez T., Amselem J., Caboche M., Hofte H., 1998. Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *The Plant Journal* 14: 643-652.
- Dice L.R., 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Ditt R.F., Nester E.W., Comai L., 2001. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10954-9.
- Dixon R.A. and Paiva N.L., 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell*, Vol. 7, 1085-1097.
- Doligez A., Bouquet A., Danglot Y., Lahogue F., Riaz S., Meredith C.P., Edwards K.J., This P., 2002. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theor. Appl. Genet.* 105: 780-795.
- Donald T.M., Pellerone F., Adam-Blondon A.-F., Bouquet A., Thomas M.R., Dry I.B., 2001. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 104: 610-618.
- Durrant W.E., Rowland O., Piedras P., Haamond-Kosack K.E., Jones J.D., 2000. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12: 963-977.
- Doyle J. J., Doyle J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Eckey C., Korell M., Leib K., Biedenkopf D., Jansen C., Langen G., Kogel K.-H., 2004. Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Mol. Biol.* 55 (1): 1-15.
- Eichmann R., Hüchelhoven R., 2011. Pflanzliche Immunität und ihre Anwendung im Pflanzenschutz. *Gesunde Pflanzen* 63: 1-9.

Endege W.O., Steinmann K.E., Boardman L.A., Thibodeau S.N., Schlegel R., 1999. Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *Biotechniques* 26: 542-8.

Felsenstein F., Baser B., 2000. Bestimmung der Virulenzeigenschaften und Wirkstoffsensitivitäten windverbreiteter pilzlicher Krankheitserreger am Getreide zur erfolgreichen Nutzung der in den Sorten vorhandenen Krankheitsresistenzen und für einen effektiven Fungizideinsatz.

<http://www.epilogic.de/BL%202000%20Bericht%20farbig%20hoch.htm>

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

Flachowski H., Schumann E., Weber W.E. and Peil A., 2001. Application of AFLP for the detection of sex-specific markers in hemp. *Plant Breeding* 120, 305-309.

Fleischer R., Horlemann C., Schwekendiek A., Kling C., Weber G., 2004. AFLP fingerprinting in hop: analysis of the genetic variability of the Tettang variety. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 211-220.

Flor H.H., 1971. Current status of the gene for gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.

Forwick J., Wunder J., Wingender R., Mösel B. M., Schnabl H. (2003): Morphometrische und molekularbiologische Erfassung und Untersuchung von Wildpflanzenpopulationen in Nordrhein-Westfalen als pflanzen genetische Ressourcen. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, 114, 139 Seiten.

Fraser L.G., Harvey C.F., Crowhurst R.N., De Silva H.N., 2004. ESR-derived microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1010-1016.

Gent D.H., Nelson M.E., George A.E., Grove G.G., Mahaffee W.F., O'camb C.M., Barbour J.D., Peetz A., Turechek W.W., 2008. A Decade of Hop Powdery Mildew in the Pacific Northwest. Online. *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2008-0314-01-RV.

Giovannoni J.J., Wing R. A., Ganai M., Tanksley S. D., 1991. Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using pools from existing mapping populations. *Nucleic Acid. Res.* 23: 6553-6558.

Godwin J.R., Mansfield J.W. und Darby P., 1987. Microscopical studies of resistance to powdery mildew disease in hop cultivar Wye Target. *Plant Pathology* 36: 21-32.

Grabowska-Joachimia A., Sliwinska E., Pigula M., Skomra U., Joachimia A.J., 2006. Genome size in *Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* SIEBOLD & ZUCC. (Cannabaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* Vol. 75, No. 3: 207-214.

- Gunn R.E., 1987. Hop breeding in England. In: Monograph XIII EBC Symposium on hops, S. 46-55.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R., 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19: 1720-30.
- Hadonou, A.M., Walden, R., Darby, P. 2004. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites for assessment of genetic variation of hops (*Humulus lupulus* L.). *Mol. Ecol. Notes* 4: 280-282.
- Haldane J. B., 1919. The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors. *Journal of Genetics* 8: 299-309.
- Hammond-Kosack K.E. and Jones J.D.G., 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Hanley S., Barker J.H.A., Van Ooijen, Aldam C., Harris S.L., Ahman I., Larsson S., Karp A., 2002. A genetic linkage map of willow (*Salix viminalis*) based on AFLP and microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 105: 1087-1096.
- Hao Y.-J., Zhang Z., Kitashiba H., Honda C., Ubi B., Kita M., and Moriguchi T., 2005. Molecular cloning and functional characterization of two apple S-adenosylmethionine decarboxylase genes and their different expression in fruit development, cell growth and stress response. *Gene* 350(1): 41-50.
- Hartl L., Seefelder S., 1998. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 96: 112-116.
- Haunold A., Likens S.T., Horner C.E., 1971. Registration of Fuggle T autotetraploid hop germplasm. *Crop Sc.* 11: 945.
- Haunold A., 1991. Cytology and cytogenetics of hops. In *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution. Part B* (edited by T. Tsuschiya and P.K. Gupta) Elsevier, Amsterdam: 551-536.
- Henning, J.A., and Moore, D.L., 1999. Hop chitinase gene. Online verfügbar unter NCBI Datenbank:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer/.fgi?db=nucleotide&val=4960048>.
- Henning J.A., Steiner J.J., Hummer K.E., 2004. Genetic diversity among world hop accessions grown in the USA. *Crop. Sci.* 44:411-417.
- Henning J.A., M.S. Townsend, D.H. Gent, N. Bassil, P. Matthews, E. Buck, R. Beatson, 2011. QTL mapping of powdery mildew susceptibility in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica* 180:411-420.
- Heyland K.-U., Hanus H., Keller E. R., 2006. Ölfrüchte, Faserpflanzen, Arzneipflanzen und Sonderkulturen. Eugen Ulmer KG, Stuttgart.

- Hisano H., Sato S., Isobe S., Sasamoto S., Wada T., Matsuno A., Fujishiro T., Yamada M., Nakayama S., Nakamura Y., Watanabe S., Harada K., Tabata S., 2007. Characterization of the soybean genome using EST-derived microsatellite markers. *DNA Res.* 14: 271-281.
- Hoffmann G. M., Niehaus F., Poehling H. M., Schönbeck F., Weltzien H. C., Wilbert H., 1994. *Lehrbuch der Phytomedizin*, 2. Auflage, Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, 542 ff.
- Hormaza J.I., Dollo L., Polito V.S., 1994. Identification of RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.* 89: 9-13.
- Hückelhoven R., Kogel K.H., 2003. Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216: 891-902.
- Hückelhoven R., 2005. Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS Microbiology Letters* 245: 9-17.
- Hückelhoven R., 2007. Cell Wall-Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:101-27.
- Hückelhoven R., 2011. Hereingebeten oder ausgesperrt: Zwei molekulare Regulatoren entscheiden über Anfälligkeit und Resistenz gegen Mehltau. <http://www.pflanzenforschung.de>.
- Jacobs, T. and L.H.M. Broers. 1989. The inheritance of host plant effect on latency period of wheat leaf rust in spring wheat. I: Estimation of gene action and number of effective factors in F1, F2 and backcross generations. *Euphytica* 44: 197-206.
- Jakse J., Kindlhofer K., Javornik B., 2001. Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers. NRC Research Press Web site <http://genome.nrc.ca>.
- Jakse J., Luthar Z., Javornik B., 2008 a. New polymorphic dinucleotide and trinucleotide microsatellite loci for hop *Humulus lupulus* L. *Mol. Ecol. Notes* 8: 769-772.
- Jakse J., Stajner N., Kozjak P., Cerenak A., Javornik B., 2008 b. Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus* L.). *Mol. Breeding* 21: 139-148.
- Jakse J., Stajner N., Luthar Z., Jeltsch J.-M., Javornik B., 2010. Development of transcript-associated microsatellite markers for diversity and linkage mapping studies in hop (*Humulus lupulus* L.). *Mol. Breeding*, Volume 28, Issue 2; Pages: 229-239.
- James C.M., Clarke J.B., Evans K.M., 2004. Identification of molecular markers linked to the mildew resistance gene *Pl-d* in apple. *Theor. Appl. Genet.* 110: 175-181.
- Jiang C., Sink K.C., 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in asparagus. *Euphytica* 94: 329-333.

- Jørgensen J.H., 1994. Genetics of powdery mildew resistance in barley. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 97–119.
- Karlov G.I., Danilova T.V., Horlemann C., Weber G., 2003. Molecular cytogenetics in hop (*Humulus lupulus* L.) and identification of sex chromosomes by DAPI-banding. *Euphytica* 132: 185-190.
- Kellerhals M., Szekely T., Sauer C., Frey J.E. und Patocchi A., 2009. Pyramidisieren von Schorfresistenzen in der Apfelzüchtung. *Erwerbs-Obstbau*, 51, (1), 21-28.
- Khattak J.Z.K., torp A.M., Andersen S.B., 2006. A genetic linkage map of *Spinacea oleracea* and localization of a sex determination locus. *Euphytica* 148: 311-318.
- Kicherer S., Backes G., Walther U., Jahoor A., 2000. Localizing QTLs for leaf rust resistance and agronomic traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 881-888.
- Kogel, G.; Beissmann, B.; Reisener, H.J. (1988): A single glycoprotein from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* cell wall elicits the hypersensitive lignification response in wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33: 173-185.
- Kohlmann H. und Kastner A., 1975. *Der Hopfen*. Hopfenverlag, Wolnzach, pp. 388.
- Koie K., Inaba A., Okada Y., Kaneko T., Ito K., 2005. Construction of the genetic linkage map and QTL analysis on hop (*Humulus lupulus* L.). *Acta. Hort.*, 668: 59-67.
- Kombrink, E., und Somssich, I.E., 1995. Defense responses of plants to pathogens. *Adv. Bot. Res.* 21, 1-34.
- Korpelainen H., Bisang I., Hedenäs L. and Kolehmainen J., 2008. The first sex-specific molecular marker discovered in the moss *Pseudocalliergon trifarium*. *Journal of Heredity* 99(6): 581-587.
- Kosambi, D.D., 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 17-175.
- Koutoulis A., Roy A.T., Price A., Sherriff L., Leggett G., 2005. DNA ploidy level of colchicine-treated hops (*Humulus lupulus* L.). *Scientia Horticulturae* 105: 263-268.
- Krofta K., Nesvadba V., 2003. How hop powdery mildew influences the quality of hops and beer? In *Proceedings of the Scientific Commission*, pp. 58-62. Ed. Seigner E. Dobrna – Zalec, Slovenia: International Hop Growers Convention.
- Lam, E., Kato, N., and Lawton, M., 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411, 848-853.
- Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg L., 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.

- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C., 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-93.
- Li Y., Kajita S., Kawai S., Katayama Y., Morohoshi N., 2003. Down-regulation of an anionic peroxidase in transgenic aspen and its effect on lignin characteristics. *J. Plant Res.* 116: 175-182.
- Liang P., Pardee A.B., 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-71.
- Liyange A. de S., 1973. Studies on resistance and overwintering in hop powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*). Phd Thesis. University of London, Wye Collage.
- Lodhi M.A., Daly M.J., Ye G.N., Weeden N.F. und Reisch B.I., 1995. A molecular marker based linkage map of *Vitis*. *Genome* 38: 786-794.
- Maliepaard C., Alston F.H., van Arkel G., Brown L.M., Chevreau E., Dunemann F., Evans K.M., Gardiner S., Guilford P., van Heusden A.W., Janse J., Laurens F., Lynn J.R., Manganaris A.G., den Nijs A.P.M., Periam N., Rikkerink E., Roche P., Ryder C., Sansavini S., Schmidt H., Tartarini S., Verhaegh J.J., Vrielink-van Ginkel M., King G.J., 1998. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theor. Appl. Genet.* 97: 60-73.
- Mandolino G., Carboni A., Forapani S., Faeti V., Randalli P., 1999. Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98: 86-92.
- Marticke, K.H.; Reisner, H.J.; Fischer, R.; Hippe-Sanwald, S., 1998. *In situ* detection of a fungal glycoprotein-elicitor in stem rust infected susceptible and resistant wheat using immunogold electron microscopy. *Eur. Cell Biol.* 76(4): 265-273.
- Michelmore R. W., Paran I. und Kesseli R. V., 1991. Identification of markers linked to the disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1212-1216.
- Miedaner T., 2010. Grundlagen der Pflanzenzüchtung. DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt am Main.
- Miehle H., and Seigner E., 2007. Production of powdery mildew resistant hop via gene transfer. In: Seigner E (Ed.), Proceedings of the Scientific Commission, International Hop Growers' Convention (IHGC), 24-28 June 2007, Tett nang, 78-81. ISSN: 1814-2192.
- Moreno J.I., Martin R., Castresana C., 2005. Arabidopsis SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *The Plant Journal* 41: 451-463.

Murakami A., Darby P., Javornik B., Pais M.S.S., Seigner E., Lutz A. und Svoboda P., 2006. Microsatellite DNA analysis of wild hops, *Humulus lupulus* L. Genetic Resources and Crop Evolution 53 (8): 1553-1562.

Murashige T. Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497.

Müllenborn C., 2009. *Sclerotinia*-induzierte differentielle Genexpression in resistenten *Helianthus*-Wildarten. Inaugural-Dissertation der Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn. http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online.

Neve R.A., 1991. Hops. Chapman and Hall, London.

Novak P., Vrba L., Matousek J., Patzak J., Fussy Z., 2005. The establishment and screening of hop genomic and cDNA libraries for genes determining *lupulin* production. *Acta horticulturae* 668:81-84.

Nürnbergger, T. und Scheel, D., 2001. Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* 6, 372-379.

Nürnbergger T., and Brunner F., 2002. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 318-324.

Oberhollenzer, K., Seigner, E., Lutz, A., Eichmann, R., Hückelhoven, R. (2011): Resistance mechanisms of different hop genotypes to hop powdery mildew. Proceedings of the Scientific Commission, International Hop Growers` Convention, Poland, ISSN 1814-2192, 21-24.

Oberhollenzer K., E. Seigner, 2012: Charakterisierung der Interaktion Hopfen-Hopfenmehltau auf Zellebene und Funktionsanalyse von an der Abwehr beteiligten Genen. Jahresbericht Sonderkultur Hopfen der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft und der Gesellschaft für Hopfenforschung 2011, S. 55-57.

Parker J.S. und Clark M.S., 1991. Dosage sex-chromosome systems in plants. *Plant Science* 80: 79-92.

Parlevliet, J. E. 1993. What is durable resistance: A general outline. In: Jacobs T.H. and Parlevliet J.E. (Eds). *Durability of Disease Resistance*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, Pages 23-39.

Patzak J., 2002. Characterization of Czech hop (*Humulus lupulus* L.) genotypes by molecular methods. *Rostl. Vyroba*, 48: 343-350.

Patzak J, Vejl P., Skupinova S., Nesvadba V., 2002. Identification of sex in F₁ progenies of hop (*Humulus lupulus* L.) by molecular marker. *Rostl. Vyroba*, 48: 318-321.

- Patzak, J., 2011. Molecular mapping of QTLs for xanthohumol and DMX contents in hop. Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, Lublin, Poland, 40-43.
- Pavan S., Jacobsen E., Visser R., Bai Y., 2010. Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Mol. Breeding* 25: 1-12.
- Peil A., Flachowsky H., Schumann E., Weber W.E., 2003. Sex-linked markers indicate a pseudoautosomal region in hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107: 102-109.
- Pillen K., Steinrücken G., Wricke G., Herrmann R.G. und Jung C., 1992. A linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theor. Appl. Genet.* 93: 333-340.
- Polley A., Seigner E., Ganai M. W., 1997. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. *Genome* 40: 357-361.
- Qi X., Stam P., Lindhout P., 1998. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor. Appl. Genet.* 96 (3/4): 376-384.
- Quiroga M., Guerrero C., Botella M.A., Barceló A., Amaya I., Medina M.I., Alonso F.J., Milradde-Forchetti S., Tigier H., Valpuesta V., 2000. A Tomato Peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* 122, 1119–1127.
- Rahman M.A. and Ainsworth C.C., 2004. AFLP analysis of genome difference between male and females in dioecious plant *Rumex acetosa*. *Journal of Biological Sciences* 4 (2): 160-169.
- Reamon-Büttner S.M, Schondelmaier J., Jung C., 1998. AFLP markers tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L. *Mol. Breeding* 4: 91-98.
- Reamon-Büttner S.M., Jung C., 2000. AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. *Theor. Appl. Genet.* 100: 432-438.
- Renganayaki K., Jesuup R.W., Burson B.L., Hussey M.A. and Read J.C., 2005. Identification of male-specific AFLP markers in dioecious Texas Bluegrass. *Crop Sci.* 45: 2529-2539.
- Roelfs, A.P., R.P. Singh, and E.E. Saari. 1992. Rust Disease of Wheat: concepts and methods of disease management. Mexico, D.F. CIMMYT: 1-81.
- Royle D. J. 1978. Powdery mildew of the hop. In. "The powdery mildews". ed. DM Spencer, Academic Press. Chapter 15: 383-410.
- Ruas C.F., Fairbanks D.J., Evans R.P., Stutz H.C., Andersen W.R., Ruas P.M., 1998. Male-specific DNA in the dioecious species *Atriplex garrettii* (Chenopodiaceae). *Am. J. Bot.* 85: 162-167.

- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T., 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.
- Sanger, F., Nicklen S., Coulson A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, No. 12: 5463–5467.
- Savelkoul P.M., Aarts H.M. , de Haas, J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J.W., Schouls L., Lenstra J. A., 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis. The state of an art. *J. Clinical Microbiol.* 37: 3083-3091.
- Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Scheel D, 1998. Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 305-310.
- Schlagenhauser S., 2006. Untersuchungen zur Infektionsbiologie von Echtem Mehltau (*Podospaera macularis*) an Hopfen (*Humulus lupulus*). Diplomarbeit.
- Schulze-Lefert P. and Panstruga R., 2003. Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 641-667.
- Schwander F., Eibach R., 2009. Neue molekulare Marker für die Rebenzüchtung zur gezielten Pyramidisierung der Resistenz gegenüber dem Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*). Nachwuchswissenschaftlerforum 2009, Julius-Kühn-Archiv 424: S. 21-24.
- Seefelder S., Ehrmaier H. und Seigner E., 1997. Powdery mildew: using DNA markers to trace resistance genes: Hopfenrundschaу-International ed., 22-29.
- Seefelder S., Ehrmaier H. und Seigner E., 1998. Genome analysis in Hops (*Humulus lupulus*). *Proc. Sci. Com. IHGC, Zatec*, 71-76.
- Seefelder S., Ehrmaier H. und Seigner E., 1999. Molecular Markers-Essential Tools in Hop Breeding. *Proc. Sci. Com. IHGC, Pulawy*, 29-32.
- Seefelder S., Ehrmaier H., Schweizer G., Seigner E., 2000. Male and female genetic linkage map of hops, *Humulus lupulus*. *Plant Breeding* 119: 249-255.
- Seefelder S., Lutz A. und Seigner E., 2005. Mapping of a powdery mildew resistance gene in hop (*Humulus lupulus* L.). In *Proceedings of the Scientific Commission, International Hop Growers Convention, George South Africa*. Edited by E. Seigner. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Hüll, Deutschland, S. 31-35.
- Seefelder S., Lutz A., Seigner E., 2006. Development of molecular markers for powdery mildew resistance support breeding for high quality hops. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 5/6: 100-102.

- Seigner E., Seefelder S., Felsenstein F., 2002: Untersuchungen zum Virulenzspektrum des Echten Mehltaus bei Hopfen (*Sphaerotheca humuli*) und zur Wirksamkeit rassenspezifischer Resistenzgene. Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst 54 (6): 147-151.
- Seigner E., Lutz A. und Felsenstein F.G., 2006: Wild hops – New genetic resources for resistance to hop powdery mildew (*Podosphaera macularis* ssp. *humuli*). Monatsschrift für Brauwissenschaft, July/August 2006 (59): 122-129.
- Seigner E., Lutz A., Oberhollenzer K., Seidenberger R., Seefelder S., Felsenstein F., 2009. Breeding of Hop Varieties for the Future. II International Humulus Symposium, ISHS, Acta Horticulturae 848: 49-57.
- Semerikov V., Lagercrantz U., Tsarouhas V., Rönnberg-Wästljung A., Alström-Rapaport C. and Lascoux M., 2003. Genetic mapping of sex-linked markers in *Salix viminalis* L. Heredity 91: 293-299.
- Shepard H.L., Parkers J.S., Darby P., Ainsworth C.C., 1999. Sex expression in hop (*Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Sieb. et Zucc.): floral morphology and sex chromosomes. In Ainsworth CC (ed) *Sex determination in plants*, Bios Scientific publishers: Oxford. 139-148.
- Shepard H.L., Parkers J.S., Darby P., Ainsworth C.C., 2000. Sexual development and sex chromosomes in hop. New Phytol. 148: 397-411.
- Sidahmed A.M.E., Wilkie B. (2010) Endogenous antiviral mechanisms of RNA interference: a comparative biology perspective. Method Mol. Biol. 623: 3-19.
- Smith T.A., Best G., 1978. Distribution of the hordantines in barley. Phytochemistry 17: 1093-1098.
- Snijders C.H.A., 1990. Response to selection in F2 generations of winter wheat for resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum*. Euphytica 50: 163–169.
- Song Q.J., Marek L.F., Shoemaker R.C., Lark K.G., Concibido V.C., Delannay X., Specht J.E. & Cregan P.B., 2004. A new integrated genetic linkage map of soybean. Theor. Appl. Genet. 109: 122-128.
- Soo W., Woo K., Ky P., 2006. Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. Plant Cell Reports 25: 1111-1121.
- Stajner N., Jakse J., Kozjak P., Javornik B., 2005. The isolation and characterization of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Science 168: 213-221.
- Stoessl, A., 1967. The antifungal factors in barley. IV. Isolation, structure, and synthesis of the hordatines. Can J Chem 45: 1745-1760.

- Strommer J., Peters J., Zethof J., de Keukeleire P., 2002. AFLP maps of *Petunia hybrida*: building maps when marker cluster. *Theor. Appl. Genet.* 105: 1000-1009.
- Takken F.L.W. and Joosten M.H.A.J., 2000. Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *Eur. J. Pl. Pathol.* 106: 699-713.
- Tanksley S.D., Ganai M.W., Prince J.W., de Vincente M.C., Bonierbale G.B., Messeguer R., Miller J.C., Miller L., Paterson A.H., Pineda O., Röder M.S., Wing R.A., Wu W., Young N.D., 1992. High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Terauchi R., Kahl G., 1999. Sex determination in *Dioscorea tokoro*, a wild yam species. In Ainsworth CC (ed) *Sex determination in plants*, Bios Scientific publishers: Oxford. 165-172.
- Teuscher E., 1997. Biogene Arzneimittel. 5. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Thordal-Christensen H., Gregersen P.L., Collinge D.B., 1999. The barley/*Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* interaction. Mechanisms of resistance to plant diseases. A. Slusarenko, Fraser R., van Loon K., Kluwer Academic Publishers: 77-100.
- Townsend M.S. and Henning J.A., 2009. AFLP Discrimination of Native North American and Cultivated Hop. *Crop Science* 49: 600-607.
- Van der Biezen E.A., Juwana H., Parker J.E., Jones J.D., 2000. cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 895-898.
- Van der Plank J. E., 1984. Disease resistance in plants. Second edition, Academic press, New York, 194.
- van Heusden A.W., van Ooijen J.W., Ginkel R.V., Verbeek W.H.J., Wietsma W.A. and Kik C., 2000. A genetic map of an interspecific cross in *Allium* based on amplified fragment length polymorphism (AFLPTM) markers. *Theor. Appl. Genet.* 100: 118-126.
- Van Ooijen J.W, Voorrips R.E., 2001. JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, Netherlands, 1-51.
- Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K.W., 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487.
- Vidhyasekaran, P., 1997. Pathogen recognizes host, host recognizes pathogen. In: Vidhyasekaran, P. (ed.): Fungal pathogenesis in plants and crops. Molecular biology and host defense mechanisms: Part I, Molecular events during early recognition process. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 11-22.

- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Horens M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Waffenschmidt S.D., Jaenicke L., 1991. Glykoproteine und Pflanzen-Zellkommunikation. *Chemie in unserer Zeit* 25: 29-43.
- Wagner H., Weber W.E. und Wricke G., 1992. Estimating relationship of isoenzyme markers and morphological markers in sugar beet (*Beta vulgaris*) including families with distorted segregations. *Plant Breed* 108: 89-96.
- Wang Z., Weber J.L., Zhong G., Tanksley S. D., 1994. Survey of plant short tandem repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88: 1-6.
- Wendehenne, D., Durner, J., and Klessig, D. , 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 449-455.
- Werner K., 2002. Kartierung und Pyramidisierung von Resistenzgenen gegen die Gelbmo-saikvirose (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) der Gerste (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*). Dissertation, Universität Gießen.
- Wiedemann R., 1991. Die vorbeugenden Bekämpfung des Echten Mehltaus 1991 an Hopfen (*Sphaerotheca humuli* Burr.). *Hopfen Rundschau*, Wolnzach: 82-85.
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., van Montagu M., Inzé D. & van Camp W., 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal* 16: 4806-4816.
- Winge O., 1929. On the nature of sex chromosomes in *Humulus*. *Hereditas* 12: 53-63.
- Wricke G. und Wehling P., 1985. Linkage between an inkompatibility locus and a peroxidase locus (*Prx7*) in rye. *Theor. Appl. Genet.* 71: 289-291.
- Yan Z., Denneboom C., Hattendorf A., Dolstra O., Debener T., Stam P., Visser P.B., 2005. Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers. *Theor. Appl. Genet.* 110: 766-777.
- Yang, Y., Shah, J. & Klessig, D.F. (1997): Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes and Development* 11, 1621-1639.
- Young W.P., Schupp J.M., Keim P., 1999. DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome. *Theor. Appl. Genet.* 99: 785-790.
- Young N.D., 2000. The genetic architecture of resistance. *Cur. Opin. Pl. Biol.* 3: 285-290.
- Zabeau M., Vos P., 1993. Keygene, Wageningen. In European Patent Application, Publication Nr. 0534 858 A.1.

Zeller F. J., Lutz J., Reimlein E. I., Limpert E., Koenig J., 1993. Identification of powdery mildew genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). II. French cultivars. *Agronomie* 13: 201-207.

Zhumabayeva B., Diatchenko L., Chenchik A., Siebert P.D., 2001. Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors. *Biotechniques* 30: 158-63.

Zierold U., Scholz U., Schweizer P., 2005. Transcriptome analysis of *mlo*-mediated resistance in the epidermis of barley. *Molecular Plant Pathology* 6(2): 139-151.

8 Anhang

8.1 Chemikalienverzeichnis

Enzyme

<i>EcoRI</i>	New England Biolabs, USA
<i>MseI</i>	New England Biolabs, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim, Deutschland
<i>PstI</i>	New England Biolabs, USA
RNase	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq-Polymerase	Eurogentec, Belgien
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, USA

Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
APS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ATP	Larova, Teltow, Deutschland
BAP	
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Pharmaia Biotech, Freiburg
BSA	New England Biolabs, USA
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chlorophorm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isoamylalkohol	J.T.Baker, Holland
D-Glucose	Duchefa Biochemie, Niederlande
DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
dNTPs	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
IPTG	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂	Eurogentec, Belgien
MOPS	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Murashige & Skoog Medium incl. vitamins	Duchefa Biochemie, Niederlande
PCR-Puffer	Eurogentec, Belgien
NaAc	Serva, Heidelberg, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumbisulfit	Merck, Darmstadt, Deutschland
NEB Puffer	New England Biolabs, USA
NEB2 Puffer	New England Biolabs, USA
NEB4 Puffer	New England Biolabs, USA
Pepton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Plant Agar	Duchefa Biochemie, Niederlande
Primer	New England Biolabs, USA
ProClin 200	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
PVP	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Soc-Medium	Qiagen, Hilden, Deutschland
TaqMaster PCR-Enhancer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TRIS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
X-Gal	Roth, Karlsruhe, Deutschland

8.2 Basislösungen

DEPC-H₂O

0,1 % DEPC

H₂O MilliQ

Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur, anschließend 2x autoklavieren

TE-Puffer

10 mM TRIS, pH 8

1 mM EDTA, pH 8

TE_{0,1}-Puffer

10 mM TRIS, pH 8

1 mM EDTA, pH 8

10x TBE-Puffer

1 M TRIS, pH 8

0,84 M Borsäure

20 mM EDTA, pH 8

DNA-Isolation

Extraktionspuffer (Doyle and Doyle 1990, modifiziert)

3 % CTAB

20 mM EDTA

1,4 M NaCl

1 % PVP (40)

100 mM TRIS, pH 8

0,2 % β-Mercaptoethanol

pH 8

Waschlösung 1

75 % Ethanol

Waschlösung 2

75 % Ethanol

Lösungen für einzelne Arbeitsgänge**Formaldehyd Gelelektrophorese****1,5 % Gel zur Bestimmung der RNA-Qualität (denaturierend)**

1,35 g Agarose

55 ml DEPC-H₂O

18 ml 5 x RNA-Elektrophoresepuffer

17 ml Formaldehyd

5x RNA-Elektrophoresepuffer (alle Lösungen mit DEPC-H₂O angesetzt)

200 ml 0,5 M MOPS pH 7

8,3 ml 3 M Natriumacetat pH 5,2

5 ml 0,5 M EDTA pH 8

287 ml DEPC-H₂O

RNA-Beladungsfarbstoff

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol FF

30 % Glycerin

RNA-Beladungspuffer

2 µl 5x Elektrophoresepuffer

3,5 µl Formaldehyd

10 µl Formamid

0,1 µl Ethidiumbromid (Konzentration: 1/10 000)

0,5 µl RNA-Beladungsfarbstoff

Agarose-Gelelektrophorese**0,8 % Agarose (100 ml-Ansatz)**

0,8 g Agarose

100 ml 1 x TBE-Puffer

5 µl Ethidiumbromid

2 % Agarosegel (100 ml-Ansatz)

2 g Agarose

100 ml 1 x TBE-Puffer

5 µl Ethidiumbromid

10x DNA Beladungsfarbstoff

30 ml Glycerin

50 ml 10 x TBE

1 Spatelspitze Bromphenolblau

PAA-Gelelektrophorese

5 % Polyacrylamidgel

85 ml 8,8 M Harnstofflösung

12,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 40 %ig

60 µl TEMED

260 µl APS

2,5 ml H₂O_{MilliQ}

Beladungsfarbstoff für PAA-Gelelektrophorese

500 ml Formamid

150 mg Bromphenolblau

150 mg Xylencyanol

10 ml 0,5 M EDTA

Klonierung

LB_{Amp}-Agarplatten

10 g/l Pepton

10 g/l Hefeextrakt

100 g/l Ampicillin-Stammlösung

15 g/l Agar

0,05 mM IPTG-Stammlösung

80 mg/l X-GAL Stammlösung

MS-BAP-Medium (für 1 Liter)

6 g Agar 0,7 %

500 ml Mill-Q

20 g Glucose 2 %
 4405,19 mg MS-Medium mit Vitaminen
 1 ml BAP (1mg/l)
 in 500 ml Mill-Q lösen, pH 5,8
 200 µl Proclin (3ppm)

8.3 Abkürzungen

A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
<i>ApaI</i>	Restriktionsendonuclease von <i>Acetobacter pasteurianus</i> sub. <i>pasteurianus</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BAP	Benzylaminopurin
bidest	Zweifach destilliertes Wasser
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
cDNA	Copy-DNA
cDNA-AFLP	Copy-DNA- Amplified Fragment Length Polymorphism
cM	centi Morgan
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNAse	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleotide
E. coli	Escherichia coli
<i>EcoRI</i>	Restriktionsendonuclease aus <i>Eschecherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	Expressed Sequence Tag
G	Guanin

h	Stunde
ha	Hektar
hl	hours post inoculation
hpi	Hektoliter
HR	Hypersensitive Reaktion
<i>HindIII</i>	Restriktionsendonuclease aus <i>Haemophilus influenzae</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
KG	Kopplungsgruppe
LB	Luria-Bertani Medium
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
LOD	Logarithm Of Odds
min	Minuten
mRNA	Messenger RNA
MS	Murashige und Skoog
<i>MseI</i>	Restriktionsendonuclease von <i>Micrococcus species</i>
mRNA	messenger RNA
MOPS	2-(N-Morpholiono)-Propansulfonsäure
NCBI	National Centre for Biology Information
NO	Stickstoffmonoxid
PAA	Polyacrylamidgel
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Pico gramm
PR-Proteine	<i>pathogenesis-related proteins</i>
<i>PstI</i>	Restriktionsendonuclease von <i>Providencia stuartii</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribonucleic Acid
RNAse	Ribonuclease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
rpm	Revolutions per minute
sec	Sekunden
SNP	Single Nucleotide Polymorphism

SSR	Simple Sequence Repeat
STS	sequence tagged site
T	Thymin
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TDF	Transcript Derived Fragment
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethyl-Ethyldiamin
TM	Trockenmasse
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic average
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

8.4 Liste der TDF-Sequenzen

Die Ergebnisse des Projektes sind geistiges Eigentum des EHRC, die dieses Projekt finanziert haben. Aus diesem Grund kann die Basenabfolge der TDFs im Folgenden nicht dargestellt werden.

>TDF_003

>TDF_004

>TDF_005

>TDF_007

>TDF_008

>TDF_009

>TDF_011

>TDF_014

>TDF_015

>TDF_016

>TDF_017

>TDF_019

>TDF_021

>TDF_022

>TDF_023

>TDF_024

>TDF_026

>TDF_027

>TDF_029

>TDF_030

>TDF_031

>TDF_032

>TDF_033

>TDF_034

>TDF_035

>TDF_036

>TDF_037

>TDF_038

>TDF_040

>TDF_041

>TDF_042

>TDF_043

>TDF_044

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die bei der Erstellung dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Vielen Dank an Prof. Dr. Weber für die Annahme des Themas an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg und für seine Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Stefan Seefelder und Dr. Elisabeth Seigner für die fachliche Betreuung und die große Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Für die ausgezeichnete technische Assistenz bei den molekularen Arbeiten und das äußerst kollegiale Klima danke ich Petra Hager, Veronika Mayer und Sabrina Petosic sehr herzlich. Weiterhin danke ich Susanne Wüllner und Alexandra Jestadt für ihre Hilfe im RNA-Labor.

Mein Dank gilt ebenso Anton Lutz und Jutta Kneidl vom Hopfenforschungszentrum Hüll für die Bereitstellung der Kartierungspopulationen und die Unterstützung in allen praktischen Fragen rund um die Hopfenzüchtung. Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern in Hüll möchte ich danken für die freundliche Aufnahme und die vielen netten Stunden v.a. bei diversen Feiern. Ein ganz besonderer Dank gilt den Mitgliedern der „Hüller Stubenmusi“ für die Aufnahme in ihre Gruppe, den vielen schönen in Erinnerung bleibenden Proben und Auftritten, und v.a. den zwischenmenschlichen Beziehungen.

Sehr herzlich danke ich Dr. Sabine Mikolajewski für ihre Unterstützung bei der Einarbeitung in die Methoden der cDNA-Analyse.

Danken möchte ich auch Steffi Hasyn von der Fa. Epilogic für die Durchführung der Mehltauinokulationen.

Für die wertvollen Gespräche und ihre moralische Unterstützung danke ich meinen Bürokolleginnen Dr. Manuela Diethelm und Dr. Kerstin Krumnacker.

Weiterhin danke ich allen Kollegen in der Arbeitsgruppe Genomanalyse für die gute Zusammenarbeit.

Von Herzen möchte ich meinen Eltern danken, ohne deren Unterstützung ich es nicht geschafft hätte, diese Arbeit fertigzustellen.

Bei Anton, der mir immer liebend zur Seite gestanden ist, und meinen Kindern Elias und Matilda, die mir klar gemacht haben, auf was es im Leben ankommt, möchte ich mich ebenfalls von Herzen für alles bedanken.

Mein besonderer Dank geht an das European Hop Research Council (Carlsberg Breweries, Heineken, InBev, Hopfenveredlung St. Johann, Hallertauer Hopfenveredlungsgesellschaft (Hopsteiner)) für die finanzielle Förderung dieser Arbeiten.

Wissenschaftliche Entwicklung

Schulbildung

1984 – 1988: Besuch der Grundschule in Freising

1988 – 1997: Besuch des Camerloher-Gymnasiums in Freising

Studium

1998 – 2004: Studium der Gartenbauwissenschaften an der Humboldt-Universität zu Berlin

Diplomarbeit am Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften an der Humboldt-Universität zu Berlin mit dem Thema „Untersuchungen zur genetischen Diversität bei *Mentha* L. und *Valeriana officinalis* L. mit Hilfe von AFLP-Markern“

Berufserfahrung

Mai 2004 – Mai 2008: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung an der bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Arbeitsgruppe Hopfen, Freising. Erarbeitung der Promotionsarbeit

seit November 2008: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung an der bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Arbeitsgruppe Heil- und Gewürzpflanzen, Freising. Projekt: „Erste züchterische Bearbeitung chinesischer Heilpflanzen, die für den Anbau in Deutschland geeignet sind“