

**Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung
Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt**

**Genexpressionsanalyse zur Ausprägung der
Lockerbeerigkeit der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.) cv.
‘Spätburgunder’**

Dem Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement
der Justus – Liebig – Universität Gießen

Als
Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Agrarwissenschaften (Dr. agr.)

vorgelegt von
M. Sc. agr. Achim Schmitt
aus Leinach

Gießen, im Juli 2009

Gutachter: Prof. Wolfgang Friedt

Gutachter: Prof. Reinhard Töpfer

Tag der Disputation: 28.09.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Tabellen	V
Verzeichnis der Abbildungen	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung des Weinbaus in Deutschland.....	1
1.2 `Blauer Spätburgunder´.....	1
1.3 Entwicklung der Weinrebe	2
1.4 Grauschimmelfäule und Lockerbeerigkeit als physikalischer Resistenzfaktor	4
1.4.1 Grauschimmelfäule	4
1.4.2 Lockerbeerigkeit als physikalischer Resistenzfaktor.....	7
1.5 Literatur basierende Kandidatengene	9
1.5.1 Sprossverzweigung.....	9
1.5.2 Infloreszenzmorphologie	10
1.6 Zielsetzung der Arbeit	11
2 Literatur	13
2.1 Microarray Hybridisierungen	13
2.1.1 Nachweis von mRNA – klassische Methoden	13
2.1.2 DNA – Chip Technologie / Microarrays	14
2.1.3 Microarray Typen	15
2.1.4 Herstellung.....	17
2.1.4.1 Trägersubstanzen.....	17
2.1.4.2 Photolithografisches Verfahren / <i>in situ</i> Technik	18
2.1.4.3 Mechanisches Microspotting	19
2.1.4.4 Gendatenbanken	21
2.1.5 Validierungsmethoden für Microarray Experimente.....	21
2.2 Real Time PCR.....	22
2.2.1 Prinzip und Technik	22
2.2.2 SYBR Green I	23
2.2.3 Quantitative Real Time PCR	24
2.2.3.1 Absolute Quantifizierung.....	24
2.2.3.2 Relative Quantifizierung.....	24
2.2.4 PCR – Effizienz.....	25
2.2.5 Auswertung.....	26
3 Material & Methoden	29

3.1 Material.....	29
3.1.1 Chemikalien, Reagenzien & Enzyme	29
3.1.2 Primer	30
3.1.2.1 Primer "Housekeeping Genes" für quantitative Real Time PCR.....	30
3.1.2.2 Primer für die Kandidatengene aus der Microarray Analyse	31
3.1.2.3 Abgeleitete Primer für die Kandidatengene aus der Literatur.....	33
3.1.2.4 Sequenzierprimer (inklusive der M13 – Universalsequenz)	34
3.1.3 Plasmid.....	34
3.1.4 Bakterienstämme	34
3.1.5 Geräte, Kits & Zubehör	35
3.1.6 Software.....	37
3.1.7 Größenstandards	38
3.1.8 Pflanzenmaterial für die Genexpressionsstudien.....	38
3.1.8.1 Auswahl des Pflanzenmaterials 2006	39
3.1.8.2 Phänotypische Beobachtung 2006	40
3.1.8.3 Probennahme 2006	40
3.1.8.4 Auswahl des Pflanzenmaterials 2007 und 2008	41
3.1.8.5 Phänotypische Beobachtung 2007 und 2008.....	42
3.1.8.6 Probennahme 2007 und 2008	42
3.1.9 Pflanzenmaterial für Arbeiten mit genomischer DNA.....	42
3.2 Methoden.....	44
3.2.1 Arbeiten mit RNA aus Pflanzenmaterial	44
3.2.1.1 Allgemeine Arbeitsschritte	44
3.2.1.2 Präparation der Gesamt – RNA aus der Weinrebe	45
3.2.1.3 DNase – Behandlung und anschließend Aufreinigung.....	46
3.2.1.4 Reverse Transkription	48
3.2.2 DNA Extraktion aus der Weinrebe.....	48
3.2.3 Gelelektrophorese.....	50
3.2.3.1 Agarose – Gelelektrophorese	50
3.2.3.2 DNA – Agarose – Gelelektrophorese.....	50
3.2.3.3 RNA – Agarose – Gelelektrophorese.....	51
3.2.4 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	51
3.2.4.1 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung	51
3.2.4.2 Elektrophoretische Konzentrationsbestimmung	52
3.2.5 Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)	52
3.2.5.1 Reverse Transkriptase – PCR	53
3.2.5.2 Gradienten – PCR	54

3.2.5.3 Touchdown – PCR	55
3.2.5.4 Kolonie – PCR.....	55
3.2.6 Microarray Analyse	56
3.2.6.1 Experimentelles Design.....	56
3.2.6.2 Genexpressionsanalyse	56
3.2.6.3 Bioinformatische Auswertung	57
3.2.6.4 Einteilung nach molekularer Funktion.....	57
3.2.7 Real Time PCR.....	58
3.2.7.1 Quantitative Real Time PCR.....	58
3.2.7.2 Auswahl der Kandidatengene.....	58
3.2.7.3 Entwicklung der Primerpaare zur Erstellung kurzer Amplifikate	58
3.2.7.4 Real Time PCR: Test der Kandidatengene.....	59
3.2.7.4.1 Experimentelles Design	59
3.2.7.4.2 Genexpressionsanalyse.....	59
3.2.7.4.3 Bioinformatische Auswertung.....	60
3.2.7.5 Real Time PCR: Kinetik 2006	60
3.2.7.6 Real Time PCR: Kinetik 2007 und 2008	60
3.2.8 Sequenzierung.....	60
3.2.8.1 Direktsequenzierung.....	60
3.2.8.2 Klonierung und Transformation.....	61
4 Ergebnisse	64
4.1 Auswahl der `Spätburgunder´– Klone für die Genexpressionsanalyse.....	64
4.2 Etablierung der RNA – Extraktionsmethode.....	67
4.3 Microarray Analyse	68
4.3.1 Proben für die Genexpressionsanalyse.....	68
4.3.2 Experimentelles Design der Genexpressionsanalyse.....	69
4.3.3 Genexpressionsergebnisse.....	69
4.3.4 Bestimmung der „Top 100“ Gene pro Vergleich	71
4.3.5 Einteilung nach molekularer Funktion	72
4.4 Real Time PCR.....	73
4.4.1 Auswahl der “Housekeeping Genes“.....	73
4.4.2 Auswahl der Kandidatengene für Lockerbeerigkeit	75
4.4.3 Quantitative Real Time PCR Experiment – Test der Kandidatengene.....	76
4.4.4 Real Time PCR Experiment – Kinetiken 2006.....	79
4.4.5 qRT PCR Experiment – Kinetiken 2007	83
4.4.5.1 Klonauswahl und Probennahme 2007	83
4.4.5.2 Auswahl der Kandidatengene.....	83

4.4.5.3 Ergebnisse Kinetiken 2007	84
4.4.6 qRT PCR Experiment – Kinetiken 2008	85
4.4.7 Vergleich 2007 mit 2008	87
4.4.7.1 Vergleich der Standorte Geisenheim und Heppenheim	88
4.4.7.2 Vergleich der beiden Versuchsjahre 2007 und 2008.....	88
4.5 Sequenzierung.....	90
4.5.1 PCR – Produkt Sequenzierung	90
4.5.2 Ergebnisse der Sequenzierung nach der Klonierung allelischer Varianten.....	92
5 Diskussion	94
5.1 Microarray Hybridisierungen	94
5.1.1 Microarray Technologie.....	94
5.1.2 Einsatz der Real Time PCR zur Validierung der Microarray Genexpressionsdaten.	95
5.1.3 Eigene Microarray Ergebnisse	96
5.2 Untersuchte Kandidatengene aus der Literatur	97
5.3 Kandidatengene für `Lockerbeerigkeit`	98
5.3.1 ERECTA (ER).....	98
5.3.2 SUPERSHOOT (SPS)	99
5.3.3 SHOOT MERISTEMLESS (STM).....	100
5.3.4 Basic Leucin Zipper 1 (bZIP 1)	101
5.3.5 LATERAL SUPPRESSOR (LAS) und REVOLUTA (REV).....	102
5.4 Schlussbetrachtung und Ausblick	103
6 Zusammenfassung	106
7 Summary	108
8 Literaturverzeichnis.....	XI
9 Anhang	XXII
Erklärung.....	XXXVIII
Danksagung	XXXIX
Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Chemikalien.....	29
Tab. 2: Enzyme	30
Tab. 3: Gerät, Kits & Zubehör.....	35
Tab. 4: Software	37
Tab. 5: Standards	38
Tab. 6: Klone für die Genexpressionsstudien	39
Tab. 7: Probennahmezeitpunkte für differentielle Genexpressionsuntersuchungen..	41
Tab. 8: Der Probensatz für die Untersuchung auf Lockerbeerigkeit	43
Tab. 9: "Sample Submission Sheet" für Affymetrix Service.....	69
Tab. 10: Getestete Referenzgene	74
Tab. 11: Ausgewählte Kandidatengene aus den Ergebnissen der Microarray Hybridisierungen	75
Tab. 12: Ausgewählte Kandidatengene aus der Literatur.....	76
Tab. 13: Ergebnisse der Kinetiken aus dem Versuchsjahr 2006	82
Tab. 14: Regulation der Kandidatengene im Versuchsjahr 2007	85
Tab. 15: Regulation der Kandidatengene im Versuchsjahr 2008	86
Tab. 16: Darstellung der Ergebnisse der Kinetiken aus den Versuchsjahren 2007 und 2008.....	87
Tab. 17: Regulation der Kandidatengene in 2007 und 2008	89
Tab. 18: SNPs in den möglichen Promotorsequenzen der Gene aus <i>Vitis vinifera</i> ...	91

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Entwicklungsverlauf der Weinrebe.....	3
Abb. 2: Beerenentwicklung.....	4
Abb. 3: `Spätburgunder´ – Klonentypen	8
Abb. 4: Infloreszenzmorphologie bei <i>Arabidopsis</i>	11
Abb. 5: Photolithographisches Verfahren zur Erstellung eines <i>in situ</i> Microarrays....	18
Abb. 6: Arrayer mit einer Kassette von 8 <i>pins</i>	19
Abb. 7: Schematische Darstellung einer Amplifikationsgrafik	22
Abb. 8: Prinzip der sequenzunabhängigen DNA – Detektion durch SYBR Green I...	23
Abb. 9: Versuchsklone 2006.....	40
Abb. 10: zusätzliche Versuchsklone 2007	42
Abb. 11: Prinzip und Verlauf der PCR	53
Abb. 12 Vektorkarte des Plasmids pCR [®] 4Blunt – TOPO [®]	61
Abb. 13: Entwicklungsstadien bei dem kompakten `Spätburgunder´– Klon 18 Gm...	64
Abb. 14: Entwicklungsstadien bei dem lockerbeerigen `Spätburgunder´– Klon 1–84 Gm.....	65
Abb. 15: Entwicklungsstadium BBCH 85 bei `Cardinal´	66
Abb. 16: Gelelektrophoresebilder extrahierter RNA aus den beiden Klonen 1–84 Gm und 18 Gm und aus der Sorte `Cardinal´	68
Abb. 17: Darstellung aller differentiell exprimierten Gene aus den Microarray Hybridisierungen.....	70
Abb.18: Darstellung der Gene, die einen größeren „fold change“ – Wert als $\pm 1,5$ aufwiesen	72
Abb. 19: geNORM Ranking der getesteten Referenzgene.....	74
Abb. 20: Ergebnisse der quantitativen Real Time PCR für die Kandidatengene aus der Literatur	77
Abb. 21: Verifizierung der Kandidatengene aus den Ergebnissen der Microarray Hybridisierungen mittels quantitativer Real Time PCR	78
Abb. 22: Kinetiken für die Transkriptionsfaktoren	89
Abb. 23: Kinetiken für die Gene mit unbekannter molekularer Funktion.....	80
Abb. 24: Kinetiken für die Kandidatengene, die aus der Literatur abgeleitet wurden.....	81

Abb. 25: Kinetiken für neun ausgewählte Kandidatengene mit dem Material des erweiterten Probensatzes aus dem Versuchsjahr 2007.....	84
Abb. 26: Kinetiken aus dem Versuchsjahr 2008.....	86
Abb. 27: Verrechnung der beiden Versuchsjahre 2007 und 2008	89
Abb. 28: Ausschnitt aus der Sequenz des mutmaßlichen Promotorbereichs des Kandidatengene SPS für die 10 Klone	90
Abb. 29: SPS Sequenzausschnitt für die Rebsorten, die in ihrem genetischen Hintergrund Pinot aufweisen.....	92
Abb. 30: Sequenzausschnitt des mutmaßlichen Promotorbereichs von bZIP	93

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
Abb.	Abbildung
BP	BREVIPEDICELLUS
bp	Basenpaar(e)
bZIP	Basic Leucine Zipper
C	Cystein
cDNA	<i>copy</i> DNA
cRNA	<i>copy</i> RNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	ERECTA
ESTs	<i>Expressed Sequence Tags</i>
EtOH	Ethanol
for	<i>forward</i> Primer
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
Gf	Geilweilerhof
Gm	Geisenheim
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HKG	<i>House Keeping Genes</i>
Hm	Heppenheim
kb	Kilobasenpaar(e)
LAS	LATERAL SUPPRESSOR
LRR	<i>Leucine - Rich Repeats</i>
LiCl	Lithiumchlorid
log	logarithmisch
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger</i> RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OH	Hydroxid
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Plex db	<i>Plant Expression Database</i>
PNY	PENNYWISE
PVP	Polyvinylpyrrolidon
qRT PCR	quantitative Real Time PCR
rev	<i>reverse</i> Primer
REV	REVOLUTA
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RZBD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
sek	Sekunde
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPS	SUPERSHOOT
STM	SHOOT MERISTEMLESS
T	Thymin
T _a	<i>Annealing</i> Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris – Acetat – EDTA – Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _m	<i>Melting</i> Temperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl) – Aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Bedeutung des Weinbaus in Deutschland

Die Rebe gehört zu den ältesten Kulturpflanzen der Menschheit. Schon mehrere Jahrtausende vor Christus wurde Wein in den Hochkulturen des Nahen Ostens, dem heutigen Ägypten, Iran und Israel, angebaut (Phillips 2003). Ihre frühe Inkulturnahme ist einmal durch die vielfältigen Nutzungsmöglichkeiten als Tafeltrauben, Rosinen, Saft, Wein und Essig zum anderen auch in der vergleichsweise einfachen vegetativen Vermehrbarkeit durch Einleger und Stecklinge begründet. Da hierdurch der Genotyp einer Pflanze problemlos erhalten und beliebig propagiert werden kann, d.h. identische Kopien (= Klone) angelegt werden, konnten sich im Verlauf von Jahrtausenden durch Vermehrung der besten Genotypen unsere heutigen Rebsorten entwickeln und teilweise über sehr lange Zeit im Anbau erhalten werden (z.B. Riesling: Ersterwähnung 1435).

Der Weinbau hat in Deutschland eine lange Tradition. Erste Nachweise gehen auf die Römerzeit zurück. Unter Kaiser Marcus Aurelius Probus (276-282 n. Chr.) erlebte der Weinbau im Land seine erste Blüte (Kreucher 2003).

Die deutsche Anbaufläche beträgt ca. 102.000 ha (Statistisches Bundesamt 2007), und wird ausschließlich zur Produktion von Wein genutzt. Die beiden größten Weinbauflächen der 13 Weinbaugebiete sind Rheinhessen (ca. 25.000 ha) und Pfalz (ca. 23.000 ha). Aufgrund der Bodenbeschaffenheit und den klimatischen Bedingungen haben sich in erster Linie weiße Sorten (ca. 65%) durchgesetzt, unter denen wiederum der `Riesling´ (21,3%) dominiert, gefolgt von `Müller – Thurgau´ (13,5%), `Silvaner´ (5,2%) und `Grauburgunder´ (4,3%). Bei den Rotweinen ist der `Spätburgunder´ (11,3%) die am häufigsten angebaute Sorte, gefolgt von `Dornfelder´ (8%), `Blauen Portugieser´ (4,5%) und `Trollinger´ (2,5%) (Statistisches Bundesamt 2007).

1.2 `Blauer Spätburgunder´

Der `Blaue Spätburgunder´, international als *Pinot noir* bekannt, ist ein Mitglied der Burgunderfamilie und eine sehr alte Sorte. Im Gegensatz zu der früheren Annahme von Regner et al. (2000), dass der `Spätburgunder´ aus einer spontanen Kreuzung zwischen `Schwarzriesling´ und `Traminer´ entstanden sein soll, geht man heute davon aus, dass der `Spätburgunder´ in fast direkter Linie

von der Wildart *V. vinifera* ssp. *sylvestris* abstammt (Aradhya et al. 2003). Im Jahr 884 n. Chr. wurde die Sorte durch Kaiser Karl III als 'Clävner' in der Bodenseeregion eingeführt (Sievers 2007). Heute wird der 'Spätburgunder' in Deutschland auf einer Fläche von ca. 11.820 ha angebaut, dies entspricht ungefähr 11% der Gesamtanbaufläche von Weinreben in Deutschland. Der 'Spätburgunder' ist somit die wichtigste Rotweinsorte in Deutschland vor dem 'Dornfelder' (ca. 8200 ha). Zur Burgunderfamilie gehören neben dem 'Spätburgunder' viele weitere Sorten, wie z.B. 'Grauburgunder', 'Weißburgunder' oder 'Frühburgunder'. Der 'Grauburgunder' ist durch eine Mutation aus 'Spätburgunder' entstanden, der 'Weißburgunder' seinerseits durch eine Mutation aus 'Grauburgunder'. Boss und Thomas (2002) konnten zeigen, dass der 'Schwarzriesling' durch eine spätere Mutation aus 'Spätburgunder' entstanden ist. Insgesamt sind die Rebsorten der 'Burgunder'-Familie sehr mutationsfreudig, das heißt über die Jahrhunderte hinweg sind durch Mutationen viele eigenständige Sorten entstanden. Darüber hinaus gibt es innerhalb der Sorte 'Blauer Spätburgunder' eine große Anzahl verschiedener Klone, die sich in einzelnen Merkmalen, wie z.B. der Art der Ausbildung des Fruchtstandes, der Beerengröße, der Traubenform oder der Blattbehaarung unterscheiden. Alleine in Deutschland stehen 68 verschiedene deutsche 'Spätburgunder'-Klone in der beschreibenden Sortenliste. Züchterisch und weinbaulich sind vor allem lockerbeerige Formen von besonderem Interesse, da sie eine höhere Botrytisfestigkeit aufweisen.

1.3 Entwicklung der Weinrebe

Die jährliche Vegetation der Weinrebe beginnt mit dem Knospenbruch im Frühjahr und endet mit dem Blattfall im Herbst. Anschließend folgt die Winterruhe bis zum nächsten Frühjahr. Es gibt mehrere Systeme, um die einzelnen Wachstumsstadien der Weinrebe zu beschreiben (Eichhorn und Lorenz 1977; Baillod und Baggiolini 1993; Lorenz und Eichhorn 1994; Meier 2001). Das System nach Meier (2001) zur Identifizierung der einzelnen Entwicklungsstadien der Weinrebe ist an die BBCH – Skala zur Beschreibung aller mono- und dikotylen Pflanzen angepasst. Die Hauptentwicklungsstadien der Weinrebe sind Austrieb, Blattentwicklung, Entwicklung der Blütenanlagen, Blüte, Fruchtentwicklung, Fruchtreife und das Eintreten der Vegetationsruhe.

Die Entwicklung der Traube beginnt mit dem Fruchtansatz nach der Blüte. Anschließend wachsen die Beeren und das Traubengerüst. Aufgrund des erhöhten Gewichtes beginnen sich die Trauben nun abzusenken. Der Traubenschluss beschließt die Entwicklung der Fruchtstände und die Beeren beginnen zu reifen. Dies geht mit der sortenspezifischen Farbveränderung (rote und weiße Sorten) einher (siehe Abbildung 1).

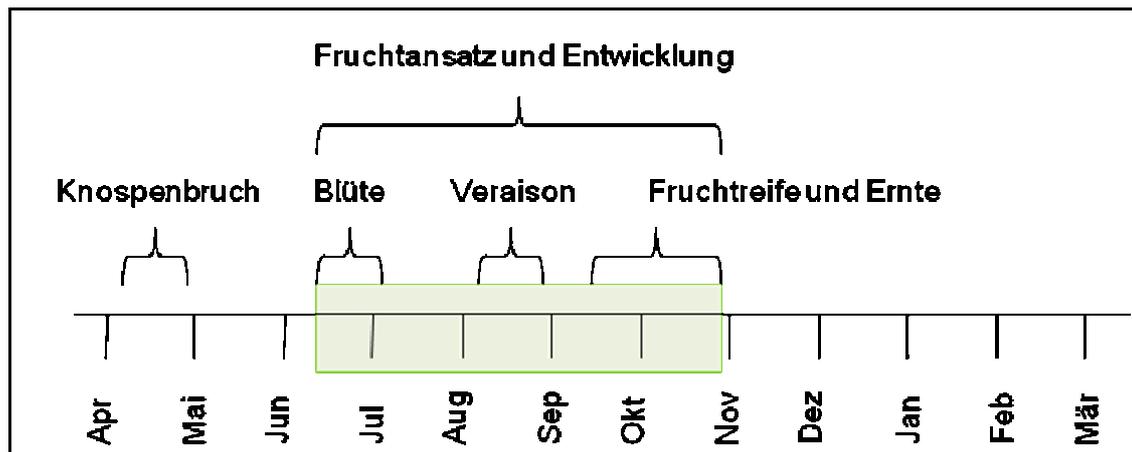


Abb. 1: Der Entwicklungsverlauf der Weinrebe in einer Vegetationsperiode. Grün unterlegt ist der Jahresabschnitt, indem sich die Fruchtstände entwickeln und bis zur Ernte reifen.

Die Beerenentwicklung setzt nach erfolgreicher Befruchtung der Blüte ein. Insgesamt entwickeln sich sortenabhängig nur aus 30 – 40 % aller Blüten reife Trauben. Gründe dafür sind nicht erfolgreiche Befruchtung oder Verrieselung. Das Beerenwachstum kann generell in drei Stadien unterteilt werden. Einem schnellen Anfangswachstum folgt eine kurze Phase langsameren Wachstums, der wiederum eine Phase mit schnellem Wachstum folgt.

In der ersten Phase des Wachstums kann eine erhöhte Zellteilung mit anschließender schneller Zellstreckung festgestellt werden. Die Beeren akkumulieren in dieser Phase Säure und die Samen erreichen mit Ende der ersten Wachstumsphase ihre volle Größe. In der zweiten Phase wachsen die Beeren langsamer. Der Säuregehalt wird langsam reduziert und die Beeren beginnen Zucker zu akkumulieren. In der finalen Phase beginnen die Beeren zu reifen. Die Veraison ist sozusagen der Start der Reife, gekennzeichnet mit der sortenspezifischen Farbentwicklung und dem Weichwerden der Beeren. In den Beeren steigen der Zuckergehalt und der pH – Wert an, während der Säuregehalt weiter sinkt. Bei Vollreife werden die Beeren geerntet. Der Erntezeitpunkt ist sortenabhängig und wird durch die Faktoren Zuckergehalt, Säuregehalt, pH –

Wert, Farbe und Aroma bestimmt. In Abbildung 2 sind schematisch das Beerenwachstum und die Kurven für die wichtigsten Ernteparameter dargestellt.

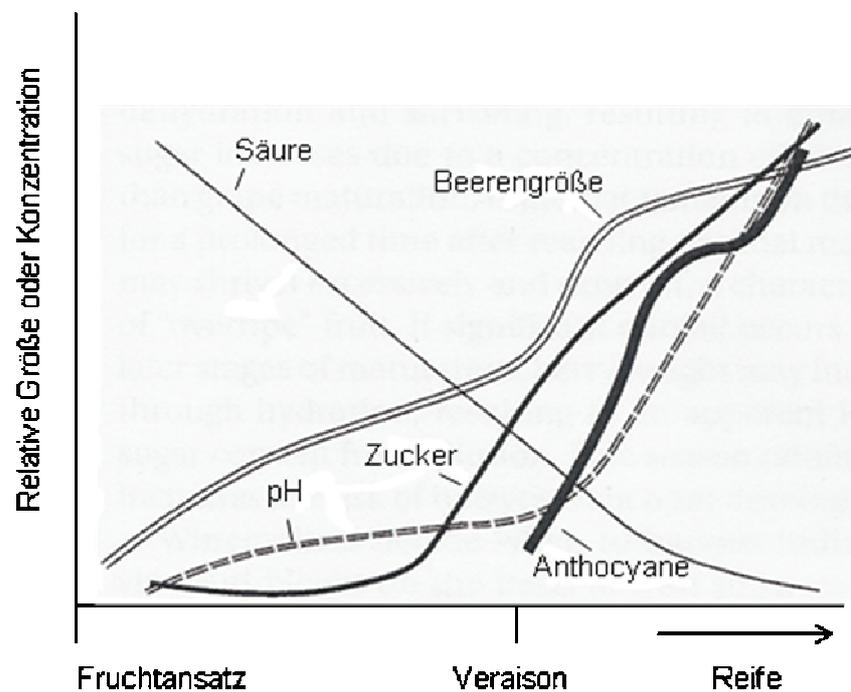


Abb.2: Entwicklungsverlauf der Beerengröße und die Verläufe der Konzentrationen wichtiger Beereninhaltsstoffe (nach Watson 2001).

1.4 Grauschimmelfäule und Lockerbeerigkeit als physikalischer Resistenzfaktor

1.4.1 Grauschimmelfäule

Die Grauschimmelfäule wird verursacht durch den Schimmelpilz *Botrytis cinerea* (syn. *Botryotinia fuckeliana*) aus der Gattung *Botrytis*. Er ist ein generalistischer Parasit, der als Wund- und Schwächepilz über 200 verschiedene Wirtspflanzen befallen kann (Reis et al. 2005). Eine besondere Bedeutung hat er im Weinbau, da er sowohl die gewünschte Edelfäule, als auch die unerwünschte Sauerfäule auslösen kann. Die erwünschte Edelfäule kann an warmen Herbsttagen an reifen Beeren ausgelöst werden. Die für das Wachstum benötigte Feuchtigkeit liefern die Frühnebel, wobei die Tage noch warm genug sein müssen, um das Abtrocknen der Beeren zu gewährleisten. Die unerwünschte Sauerfäule tritt bei feuchtwarmer Witterung bei einem Mostgewicht von unterhalb 60° Öchsle auf. Die unreifen befallenen Beeren werden nicht mehr reif und somit für die Weinherstellung unbrauchbar. Neben den negativen Auswirkungen auf den Ertrag und die

Verarbeitungsqualität stellt *Botrytis* durch sein hohes allergenes Potential eine Gefährdung für die menschliche Gesundheit dar (Green et al. 2003).

Im Gegensatz zu den Erregern des falschen Mehltaus (*Plasmophera viticola*) und des echten Mehltaus (*Uncinula necator*) wird ein *Botrytis* – Befall von der Rebe normalerweise sehr gut abgewehrt. Einem möglichem Befall von *Botrytis* setzt die Rebe als Elemente der Abwehr ihre Cuticula als äußerste Abgrenzung von Blatt bzw. Traube, ihre Epidermis mit deren Gerbstoffen als äußerste Zellschicht von Blatt bzw. Traube und ihrer speziellen Zellinhaltsstoffe in den Geweben, die eine Abgrenzung zum befallenen Gewebe herstellen und somit einen Wundabschluss erzeugen können, entgegen. Zu Schäden kommt es meist nur dann, wenn die natürlichen Abwehrbarrieren und aktiven Abwehrmaßnahmen außer Funktion gesetzt oder geschwächt sind. Deshalb haben kulturtechnische Maßnahmen, welche die klimatischen Einflüsse positiv zugunsten der Rebe verändern, wie beispielsweise ein aufrechtes, gut belichtetes und durchlüftetes Erziehungssystem oder Laubarbeiten, welche die Durchlüftung und Belichtung in der Traubenzone fördern einen entscheidenden Einfluss auf die Stärke des Befalls (Jörger 2005).

Es gibt zwei eindeutig unterscheidbare Angriffswege für *Botrytis*. Beeren kann *Botrytis* nur angreifen, wenn die Abwehrfähigkeit der Beeren mit zunehmender Reife abnimmt. Bei feuchtwarmer Witterung können *Botrytis* – Sporen auf der Beere auskeimen und diese durch das Ausschütten großer Enzymmengen angreifen. Die Beerenhaut hat je nach Sorte Poren, durch welche Nährstoffe an die Oberfläche der Beerenhaut gelangen können (siehe S. 7). Die Beerenhaut wird mit zunehmender Reife mürbe, so dass bei zu starker Wasseraufnahme in Regenperioden zusätzliche Risse entstehen können, aus denen weiterer Beerensaft austreten kann. Sehr rasch besiedelt *Botrytis* diese nährstoffreichen Areale. Es entwickeln sich kleine braune Flecken, welche sich schnell vergrößern. Diese Symptomatik ist insbesondere bei Sorten wie 'Müller – Thurgau' und 'Chardonnay' zu beobachten. Bei diesen Sorten bricht die Widerstandsfähigkeit bei ca. 60° Öchsle schlagartig zusammen, so dass bei feuchter Witterung innerhalb weniger Tage massive Beerenfäulnis auftreten kann.

Bei 'Riesling' und 'Kerner' liegt diese Schwelle bei ca. 80° Öchsle. Relativ robust gegen *Botrytis*befall sind 'Trollinger', 'Lemberger' und 'Dornfelder' (Kast et al. 2005).

Der zweite Angriffsweg geht von den latenten Infektionen aus. Achleitner (2008) konnte in ihrer Arbeit nachweisen, dass bereits zur Blüte der Rebe eine native Infektion der Fruchtsätze erfolgen kann. Sowohl Beeren als auch Gerüstpartien zeigen sich dann oft früh befallen. Blüte- bzw. Nachblüteinfektionen verbleiben zunächst latent ("latente Infektion") während des Beerenwachstums und werden erst sichtbar, wenn die Bedingungen während der Reifezeit (Zuckereinlagerung, Säureabbau) für den Pilz immer förderlicher werden.

Dabei profitiert der Pilz vom für ihn günstigen Mikroklima im Innern der Trauben und von den bei kompakten Trauben auftretenden Spannungen, die gerade dort, wo der Erreger latent sitzt, an den Beerenansatzstellen, am größten sind. Bei lockeren Trauben lösen sich oft die betreffenden Beeren ab und fallen nicht weiter auf. Bei kompakten Trauben bildet sich meist von der Traubenmitte ausgehend ein Fäulnisnest. Zu Beginn des Befalls kann man deutlich erkennen, dass dieser vom Beerenansatz ausgeht, da der Pilz dort am weitesten entwickelt ist und an diesen Stellen bereits sporuliert. Entscheidend für das Eintreten dieser zweiten Befallsart ist zum einen das Vorkommen latenter Infektionen, zum anderen spielt aber auch die Kompaktheit der Trauben eine große Rolle. Diese hängt sehr stark von den Blühbedingungen, der Wasserversorgung sowie der Ertragsbelastung ab. Insbesondere bei kompakten Sorten wie 'Riesling', 'Schwarzriesling' und vielen Burgundersorten und -Klonen, stehen deshalb Maßnahmen gegen die Kompaktheit und die Bekämpfung der latenten Infektionen im Vordergrund (Kast et al. 2005).

Gegen die direkten Infektionen über die Beerenhaut ('Müller-Thurgau'-Typ) wirken Fungizide am besten, wenn die Konzentration des Wirkstoffes auf den reifen Trauben noch hoch ist. Das bedeutet eine möglichst späte Applikation unter Beachtung und Einhaltung der Wartezeit, in der Regel bei 30 - 40° Oechsle. Je größer der Abstand zwischen Spritztermin und der Traubenreife ist, desto geringer ist die Wirksamkeit gegen diesen Infektionstyp. Gegen den 'Schwarzriesling' - Infektionstyp, also gegen latente Infektionen, sind Fungizide in der Phase der Blüte bis kurz vor Traubenschluss am wirksamsten. Für beide Infektionstypen liegt der ungünstigste Applikationszeitraum in der Periode zwischen Traubenschluss und Weichwerden der Beeren. In dieser Periode wird keiner der beiden Infektionstypen optimal mit den Fungiziden getroffen. Oberstes Ziel der Botrytisbekämpfung ist dabei die Sicherung der Weinqualität. Größere

Qualitätseinbußen als der Botrytisbefall verursachen andere Mikroorganismen, wie z.B. Schimmelpilze, Hefen und Bakterien, welche in der Regel erst sekundär auf den von *Botrytis* zerstörten Beeren wachsen können. Sie entwickeln sich also mit zunehmendem Botrytisbefall. Ihr Auftreten kann im günstigen Fall durch das Verhindern des Botrytisbefalls unterbunden werden. Sobald jedoch Risse in der Beerenhaut auftreten oder sich die Beeren bei kompakten Trauben abdrücken, sind diese Mikroorganismen auch ohne eine *Botrytis* – Infektion in der Lage, sich an den verletzten Stellen zu entwickeln und den Weingeschmack sehr stark negativ zu beeinflussen, obwohl die Trauben relativ gesund aussehen (Kast et al. 2005).

1.4.2 Lockerbeerigkeit als physikalischer Resistenzfaktor

Große Unterschiede in der Botrytisanfälligkeit bestehen bei Rebsorten der Burgunderfamilie. So zeigen beispielweise die lockeren Geisenheimer– und Mariafeld – `Spätburgunder´– Klone eine relativ gute physikalische Resistenz gegenüber *Botrytis*. Kompakte Sorten wie `Schwarzriesling´ oder `Samtrot´, sowie die kompakten `Spätburgunder´– Klone können dagegen unter sehr starkem Befall leiden. Die `Spätburgunder´– Klone lassen sich gemäß Porten (2001) in vier verschiedene Gruppen einteilen: kompakte, lockerbeerige, mischbeerige und aufrechtwachsende Klone, wobei sich die lockerbeerigen Klone in Mariafeld– und Geisenheim – Typen aufteilen. Aufrechtwachsende Klone zeichnen sich dabei durch einen aufrechten Wuchs aus, wodurch die Durchlüftung und die Belichtung in der Traubenzone gefördert werden. Die anderen drei Klon – Typen werden aufgrund ihrer Traubenmorphologie unterschieden.

Die Ausprägung der Traubenmorphologie wird durch die Trauben– und die Beerenstruktur beeinflusst. Wichtige Faktoren für die Traubenstruktur sind Beerengröße, Beerenanzahl pro Traube, Beerendichte, Struktur des Stielgerüsts und die Länge der Beerenstielchen. Die Beerenstruktur wird durch die Einzelfaktoren Beerenhaut, Beerenalter, Beerenelastizität, den Zuckergehalt der Beeren und den Ansatzpunkt der Beeren beeinflusst.

Die Einzelfaktoren der Beerenstruktur sind hauptsächlich vom Stand der Reifeentwicklung abhängig und können nur im geringen Umfang durch Züchtung beeinflusst werden. Schon früh wurde erkannt, dass die mechanisch – physikalischen Eigenschaften der Beerenhaut als möglicher Resistenzfaktor

gegenüber einem Pilzbefall wirken können (Alleweldt et al. 1981). Gärtel (1970) konnte zeigen, dass es unter Anderem Unterschiede in der Benetzbarkeit der Beerenoberflächen verschiedener Rebsorten gibt. Dies ist auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der Cutinschicht bzw. auf die Struktur der Wachsschicht auf den Beerenhäuten zurückzuführen. In anderen Arbeiten konnte festgestellt werden, dass die Permeabilität der Beerenhäute im Verlauf der Beerenreife für verschiedene Inhaltsstoffe der Beeren, vor allem Zucker und Aminosäuren, zunimmt (Kosuge et al. 1964). Dies konnte durch Blaich et al. (1984) bestätigt werden. In ihrer Arbeit konnten Blaich et al. (1984) zudem submikroskopische Perforationen der Cuticula nachweisen, deren Anzahl von der Rebsorte und dem Reifegrad der Beeren abhängig waren. Es wurde außerdem gezeigt, dass diese Perforationen in enger Beziehung zu der *Botrytis* – Anfälligkeit stand.

Manche Einzelfaktoren der Traubenstruktur können hingegen durch die Züchtung beeinflusst werden. Dies geschieht insbesondere durch eine Selektion von gewünschten Formen aus der vorhandenen oder züchterisch erzeugten Formenvielfalt innerhalb der unterschiedlichen Sorten. Wie bereits erwähnt, lassen sich die `Spätburgunder´– Klone in verschiedene Gruppen einteilen. Kompakte, locker– und mischbeerige Klone werden aufgrund ihrer Traubenmorphologie unterschieden (siehe Abb.3). Kompakte Klone zeichnen sich durch sehr kompakte Fruchtstände aus, die durch verringertes Achsenwachstum oder durch erhöhte Beerenanzahl verursacht werden. Die Beerengröße ist meistens relativ gering bei den kompakten Klonen.



Abb. 3: Die drei verschiedenen Klontypen bei `Spätburgunder´ (von links nach rechts): Kompakt, mischbeerig und lockerbeerig (Fotos: E. Schönhals)

Lockerbeerige Klone weisen meist ein erhöhtes Wachstum des Traubengerüstes und eine verringerte Anzahl an Beeren auf, wobei die Beeren jedoch meistens größer sind als die der kompakten Klone. Mischbeerige Klone weisen in Folge von unterschiedlich großen Beeren an einer Traube eine verringerte Beerendichte auf. Ein Vorteil dieser Klone ist der meist deutlich erhöhte Schalenanteil im Vergleich zu den lockerbeerigen Klonen (Jörger 2005). Ein erhöhter Schalenanteil ist erwünscht, da die meisten Aromastoffe in der Beerenschale lokalisiert sind.

In Langzeitversuchen über 10 Jahre konnte gezeigt werden, dass die kompakten Klone im Mittel der Jahre 25 % Botrytisbefall aufwiesen. Der Botrytisbefall an lockerbeerigen Geisenheimer Klonen betrug in dieser Zeit im Mittel nur rund 3 %. Somit konnte deutlich gezeigt werden, dass die Traubenmorphologie einen großen Einfluss auf die Widerstandsfähigkeit gegenüber *Botrytis* hat (Porten. 2004).

1.5 Literatur basierende Kandidatengene

Die Architektur einer höheren Pflanze wird hauptsächlich durch Faktoren bestimmt, welche die Sprossverzweigung, die Pflanzenhöhe und die Infloreszenzmorphologie beeinflussen. In vielen Studien der Modellpflanze *Arabidopsis* und auch in den Kulturpflanzen Tomate, Reis und Mais konnten Gene isoliert und charakterisiert werden, die direkt die Pflanzenarchitektur beeinflussen. Viele dieser Gene sind zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen konserviert, was auf ähnliche regulatorische Wege bei der Ausbildung der Pflanzenarchitektur schließen lässt (Wang et al. 2006).

1.5.1 Sprossverzweigung

Die Sprossverzweigung ist ein wichtiger Faktor für eine variable Pflanzenarchitektur. Die Entwicklung von Sprossverzweigungen kann in zwei wichtige Schritte eingeteilt werden, in die Initiierung von neuen apikalen Meristemen und den Auswuchs der Seitenknospen. Durch die Untersuchung von Mutanten unterschiedlicher Pflanzenarten, die eindeutige Defekte in der Initiierung neuer apikaler Meristeme oder im Auswuchs der Seitenknospen aufweisen, konnten tiefere Einblicke in den Prozess der Sprossverzweigung gewonnen werden. Es ließen sich einige Gene identifizieren, die eine Schlüsselfunktion in der Initiierung neuer apikaler Meristeme einnehmen. In der Modellpflanze *Arabidopsis* konnte den Genen LATERAL SUPPRESSOR (LAS) (Greb et al. 2003), REVOLUTA (REV) (Talbert et al. 1995) und SUPERSHOOT (SPS) (Tantikanjana et

al. 2001) eine solche Schlüsselrolle zugeordnet werden. In der Tomate wurde neben dem LATERAL SUPPRESSOR (LS), homolog zu LAS, (Schuhmacher et al. 1999) auch das Gen Blind (Schmitz et al. 2002) als Schlüsselgen identifiziert. Bei Reis konnte das Schlüsselgen MONOCULUM 1 (Li et. al 2003) als Schlüsselgen identifiziert werden. Defekte in diesen Schlüsselgenen führen zu stark reduzierten Sprossverzweigungen, sowohl in der vegetativen als auch in der generativen Entwicklungsphase.

Der Auswuchs der Seitenknospen wird von der apikalen Dominanz unterdrückt. Kommt es zu einem Verlust dieser apikalen Dominanz, können die Seitenknospen wachsen, was zu einer Sprossverzweigung führt. Dem Phytohormon Auxin (Indol-3-essigsäure) wird dabei z.B. eine Schlüsselrolle in der apikalen Dominanz und der Zellteilung zugerechnet (Stirnberg et al. 1999). Bei der *Arabidopsis* Mutante BUD 1 konnte eine erhöhte Sprossverzweigung festgestellt werden, da die Apikaldominanz aufgrund eines defekten Auxintransportes verloren gegangen ist (Dai et al. 2006). Aber Auxin spielt nicht allein eine Rolle in der Apikaldominanz. Das Pflanzenhormon Cytokinin, welches in den Wurzeln gebildet wird und zu den Sprossknospen transportiert wird, führt zur Aufhebung der Keimruhe der Knospen und fördert so die Sprossverzweigung (Palni et al. 1988). Die Cytokininkonzentration wird durch Auxin reguliert (Nordström et al. 2004). Ein alternativer Weg zur Förderung des Auswuchses der Seitenachsen konnte mit der Isolierung und der Charakterisierung der *Arabidopsis* Gene MORE AXILLARY GROWTH 1 – 4 (Stirnberg et al. 2002) identifiziert werden. Hier spielen Carotinoid – abgeleitete Signalmoleküle eine Rolle in der Sprossverzweigung.

1.5.2 Infloreszenzmorphologie

Die Infloreszenzmorphologie einzelner Pflanzen einer Art kann sich stark unterscheiden. Sie trägt nicht nur zur Ausprägung der Pflanzenarchitektur bei, sondern spielt auch eine wichtige Rolle für den Ertrag der einzelnen Pflanzen. Den *Arabidopsis* Genen REV, COMPACT INFLORESCENCE (CIF) (Goosey et al. 2001) BREVIPEDICELLUS (BP) (Venglat et al. 2002), PENNYWISE (PNY) (Smith et al. 2003), sowie ERECTA (ER) (Torii et al. 1996) wird eine wichtige Rolle in der Regulation der Infloreszenzarchitektur zugesprochen. Beispielsweise zeigen Mutanten mit einem Defekt im Gen CIF eine starke Reduktion in der Länge der Internodien der Infloreszenzen. Der Grund hierfür ist eine verringerte Zellstreckung

(Goosey et al. 2001). Eine ähnliche phänotypische Ausprägung kann in BP und ER *Arabidopsis* Mutanten beobachtet werden (Venglat et al. 2002). Bei diesen Mutanten ist das Längenwachstum der Blütenstielchen reduziert, was zu herunterhängenden Blüten und kompakten Infloreszenzen führt. BP codiert für ein Protein mit der Homeodomäne KNAT1, die ein Mitglied der KNOTTED 1 – ähnlichen Homeobox (KNOX) homeotischen Gene ist.

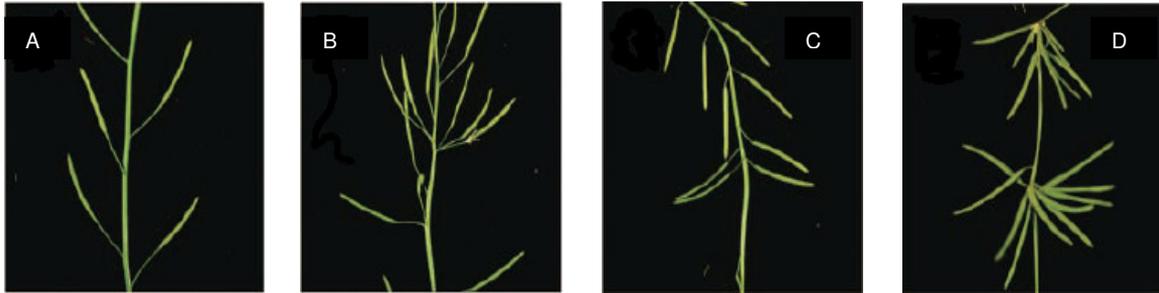


Abb. 4: Verschiedene Infloreszenzenmorphologien bei *Arabidopsis* (von links nach rechts): (A) Ein Wildtyp von *Arabidopsis* mit normalen Längenwachstum der Blütenstielchen und der Internodien. (B) Die Infloreszenz einer PNY – Mutante weist verkürzte Internodien am Stängel auf. (C) Für BP – Mutanten sind die verkürzten Blütenstielchen und die nach unten zeigenden Blüten / Schoten charakteristisch. (D) BP/PNY – Doppelmutanten zeigen sowohl stark verkürzte Internodien als auch Blütenstielchen (Smith et al. 2003).

Zu dieser Familie gehört auch das Gen PNY. PNY zeigt wie BP verkürzte Blütenstielchen und teilweise verkürzte Internodien des Stängels (Smith et al. 2003). In Abbildung 4 sind beispielhaft die Infloreszenzen einer BP – Mutante, einer PNY – Mutante und einer BP/PNY – Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp abgebildet.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die in dieser Arbeit bearbeitete Fragestellung war ein Teilaspekt des Verbundprojektes „Untersuchung zur Existenz und zum Ausmaß genetischer Variation traditioneller Rebsorten im Hinblick auf die Erhaltung genetischer Ressourcen. Alte, traditionelle Rebsorten haben auch im modernen Weinbau eine große Bedeutung. Der Schutz und die Erhaltung sowie die Erforschung dieser breiten genetischen Variation zwischen und innerhalb der Sorten ist ein wichtiger Beitrag zur Nutzung der rebengenetischen Ressourcen.

Die genetische Variation innerhalb der Rebsorten ist aus Kleinmutationen und Anpassungsprozessen entstanden. Sehr verschiedenartige Spielarten, klonale Formen oder gar eigenständige Sorten entwickelten sich durch diese Prozesse.

Viele Spielarten von Rebsorten weisen nur minimale Unterschiede auf, sind daher phänotypisch oft schwer als diese zu erkennen und lassen sich nur sehr schwierig innerhalb einer Rebsorte abgrenzen. Die Zahl unterschiedlicher Genotypen innerhalb einer Sorte kann sehr groß sein und somit ist die Untersuchung von relevanten Merkmalen, die Wichtiges von Unwichtigem und Einzigartiges von der breiten Masse abzugrenzen helfen, dringend erforderlich.

Das Ziel des Teilprojektes war die Identifizierung von Kandidatengen, die während der Entwicklung der Trauben zwischen kompakten und lockerbeerigen Klonen differentiell exprimiert sind und somit eine lockere Struktur des Traubengerüsts bewirken können. Hierfür wurden an relevantem Pflanzenmaterial, Infloreszenzen und Traubengerüsten in verschiedenen Entwicklungsstadien, Genexpressionsanalysen mittels molekularer Profilingtechniken, wie der Microarray – Hybridisierung (siehe Kapitel 2.1) und der quantitativen Real Time PCR (siehe Kapitel 2.2) durchgeführt. Um interessante Kandidatengene zu identifizieren, wurden zum einen ein kompakter und ein lockerbeeriger Klon mittels Microarray Hybridisierungen auf differentielle Genexpression hin analysiert, zum anderen ausgewählte Kandidatengene aus der Literatur untersucht, die bekanntermaßen Merkmale ähnlich der Lockerbeerigkeit in orthologen Pflanzen beeinflussen. Unter Verwendung der qRT PCR wurden die Kandidatengene aus der Literatur auf differentielle Genexpression zwischen kompakten und lockerbeerigen Klonen untersucht.

Für die Kandidatengene, die eine reproduzierbare signifikant differentielle Genexpression zwischen kompakten und lockerbeerigen Klonen an verschiedenen Standorten und in verschiedenen Versuchsjahren zeigten, sollten die mutmaßlichen Promotorbereiche bestimmt, und durch anschließende Sequenzierung auf mögliche Polymorphismen untersucht werden. Abschließend sollte getestet werden, ob es möglich ist, anhand der gefundenen Sequenzunterschiede molekulare Marker für das Merkmal Lockerbeerigkeit zu entwickeln, um diese später in der Züchtung einsetzen zu können.

2 Literatur

2.1 Microarray Hybridisierungen

2.1.1 Nachweis von mRNA – klassische Methoden

Die Analyse von DNA, RNA und Proteinen mittels Auftrennungsmethoden wie z.B. der Gelelektrophorese kann Aufschluss über die Größe und den Zustand des jeweiligen Moleküls geben. Mit diesen Methoden ist es aber nicht möglich, Informationen über die genaue Identität oder das Expressionsverhalten einer Probe zu erlangen. Für solche Fragestellungen sind PCR – Analysen, Sequenzierungen und Hybridisierungen die Methoden der Wahl. Im folgenden werden zunächst einige klassische Methoden, die auf Hybridisierungen beruhen, vorgestellt, anschließend die neuere Microarray Technologie.

Die Hybridisierung von Nukleinsäuren beruht auf dem Prinzip, dass komplementäre Basen zweier Nukleinsäureeinzelstränge jeweils durch Wasserstoffbrückenbindungen eine Paarung eingehen können. Das Prinzip der Hybridisierung einer markierten Nukleinsäure zur Identifizierung von unbekanntem Nukleinsäurefragmenten wurde erstmals als *in situ* – Hybridisierung (ISH) (Pardue & Gall 1969; John et al. 1969) an Gewebeschnitten eingesetzt. Mit Hilfe dieser Methode können Nukleinsäurefragmente z.B. in Geweben und Zellen lokalisiert werden. Dazu werden einzelsträngige Nukleinsäuren mit einer Markierung (z.B. radioaktive Markierung, Fluoreszenzmarker) versehen und als Sonde zum Hybridisieren eingesetzt. Die Verwendung von Fluoreszenz – gekoppelten Sonden wird als FISH – Methode bezeichnet.

Im Jahre 1975 wurde von E. M. Southern eine Methode entwickelt, die den Transfer von isolierten Nukleinsäuren auf synthetische Membranen mit anschließender Detektion erlaubt. In dieser Methode ("Southern Blot") wird die Affinität von DNA – Molekülen, sich leicht an Nylon – oder Nitrozellulose – Membranen anzuheften, genutzt, um diese durch Hybridisierung mit markierten, komplementären Sonden identifizieren zu können. Diese Methode ist auch für RNA – Fragmente anwendbar (Alwine et al. 1977) und wird "Northern Blot" genannt. Das Prinzip beider Methoden ist der Transfer von Nukleinsäurefragmenten aus einem Gel über Kapillarkräfte auf eine Nylon – oder Nitrozellulose – Membran. Die Nukleinsäurefragmente werden durch backen (bei

70 – 80 °C) oder UV „crosslinking“ und inkubieren in milden alkalischen Lösungen auf der Membran fixiert. Nach dem Transfer wird die Membran gewaschen. Die Membran bildet nun das Spiegelbild des Gels, aus der die DNA – oder RNA – Moleküle transferiert wurden. Um diese Moleküle identifizieren zu können, müssen markierte Sonden mit der Membran in Kontakt gebracht und hybridisiert werden. Als Sonden können Oligonukleotide oder einzelsträngige RNA – oder DNA – Fragmente verwendet werden. Diese sind entweder radioaktiv, oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Mit den Sonden ist es möglich, die gewünschten DNA / RNA – Fragmente zu identifizieren, wenn sie sich erfolgreich bzw. stabil anlagern.

Northern Hybridisierungen werden oft dazu verwendet, um die Größe von RNAs sowie ihr Vorkommen im zu untersuchenden Gewebe zu bestimmen. Diese Methode ist auch heute noch eine Standardmethode in der Molekularbiologie. Eine Weiterentwicklung des “Southern / Northern“ Blots ist die Dot– / Slot – Hybridisierung auf geladenen Membranen (Kafatos et al. 1979). Bei dieser Methode können mehrere DNA – oder RNA – Präparationen auf einer Membran gleichzeitig fixiert werden.

2.1.2 DNA – Chip Technologie / Microarrays

Seit den neunziger Jahren hat die DNA – Chip bzw. Microarray Technologie die Einsicht in Gene oder auch ganze Genome revolutioniert. Bedingt durch die zunehmende Entwicklung der Genom – Sequenzierungen und der daraus resultierenden zunehmenden Menge an Sequenzdaten von Organismengenomen, wie auch die vollständige Aufklärung z.B. der Sequenz des menschlichen Genoms (Human Genome Project) (Sawicki et al. 1993) und des *Vitis vinifera* Genoms (Vitis Genome Project) (Jaillon et. al 2007); (Velasco et al. 2007) sind für die weitergehenden Untersuchungen multiparallele Analyseverfahren gefragt, welche die Funktion von einzelnen Genen wie auch deren Zusammenspiel erkunden. Eine vielversprechende Methode zum Auffinden von Genen (“Genemapping“) in unterschiedlichen Zelltypen, Monitoring von Genexpressionsmustern sowie SNP – Analysen (“Genotyping“) stellt die Microarray Technologie dar, mit der als Hochdurchsatzverfahren inzwischen mehr als 900.000 Gensequenzen (Genome – Wide Human SNP Array 6.0 von Affymetrix) simultan in einem Experiment untersucht werden können.

2.1.3 Microarray Typen

Es gibt zwei verschiedene Typen von Microarrays: den cDNA – Microarray und den Oligonukleotid – Microarray. Der cDNA – Microarray wurde als erstes im Brown – Labor der Stanford Universität etabliert (Schena et al. 1995). Hierbei werden cDNAs auf einer Oberfläche immobilisiert und als Sonden mit der zu untersuchenden DNA / cDNA oder RNA hybridisiert. Die als Sonden verwendeten cDNAs werden mittels PCR amplifiziert und anschließend auf die Trägerfläche aufgebracht. Meistens werden die cDNA – Microarrays je nach Fragestellung in den Laboratorien selbst hergestellt, können aber auch im Service bei verschiedenen Anbietern produziert werden. Die Herstellung ist sehr aufwändig, da für ein Hochdurchsatzverfahren Tausende von PCR – Reaktionen durchgeführt werden müssen. Die PCR – Fragmente müssen für das “Spotten“ anschließend gereinigt werden. Erschwerend kommt hinzu, dass die Amplifikate ähnliche Schmelztemperaturen und Größen (normalerweise um 200 bp) aufweisen müssen, damit es beim eigentlichen Experiment, der Hybridisierung der zu testenden Probe, zu keinen unbeabsichtigten Präferenzen kommt. Dementsprechend stringent müssen die Primer für die PCR ausgewählt werden. Ein großer Nachteil dieser Art von Microarrays ist oft die hohe Fehlerrate bei der Hybridisierung (bis zu 40%). Fehler können durch Kontamination von Klonen während der Vermehrung der cDNA – Sequenzen in bakteriellen Plasmiden verursacht werden, aber auch durch Kreuzhybridisierungen, alternatives Splicing oder Sequenzierfehler entstehen (Halgren et al. 2001, Quakenbush 2002).

Der zweite Microarray – Typ ist der Oligonukleotid – Microarray. Bei dieser Methode werden Oligonukleotide oder PNAs (“Peptide nucleic acid“) entweder direkt auf einem Chip (*in situ*) synthetisiert oder nach ihrer Synthese auf einem Chip immobilisiert und mit einer oder mehreren DNA / cDNA – oder RNA – Targets hybridisiert. Auf diese Weise können komplementäre Sequenzen identifiziert werden. Diese Methode wurde von der amerikanischen Firma Affymetrix Inc. entwickelt. Affymetrix Inc. ist heute einer der Hauptanbieter von Oligonukleotid – Microarrays (Lockhart et al. 1996). Kommerziell sind über 50 verschiedene Oligonukleotid – Microarrays für verschiedenste Anwendungen verfügbar. Die Microarrays werden alle für bestimmte Zwecke (z.B. Expression Profiling bei *Vitis vinifera*) hergestellt. Bei der Hybridisierung der zu testenden Proben wird jedes Hybridisierungssignal pro Target (= Zielsequenz) durch ein

Cluster (= Gruppe, Satz) von bis zu 20 Oligonukleotidpaaren realisiert. Jedes Oligonukleotidpaar besteht aus einer perfekten Basenpaarung ("Perfect Match") und einer Einzelbasen – Misspaarung ("Single Base Mismatch"). Diese Strategie wird „Perfect Match/Mismatch“ (PM/MM) genannt. Die Hintergrundhybridisierungen mit den MM Sonden wird von den PM Proben subtrahiert, um aussagefähigen Hybridisierungsdaten zu erhalten.

Die GeneChips von Affymetrix haben eine sehr geringe Falschpositiv – Fehlerrate von nur 1 – 2% (Lipshutz et al. 1999). Bedenkt man jedoch, dass bei einer Analyse z.B. 10.000 Gene analysiert werden, entsprechen 1% immer noch 100 falschpositiven Aussagen (Quakenbush et al. 2002).

Die Analysen der zu untersuchenden DNA – oder RNA – Proben erfolgen bei beiden Microarray – Typen mittels Hybridisierungen. Die DNA, cDNA oder RNA wird dafür mit einem Fluorophor angefärbt (z.B. CY3, CY5) oder mit Biotin (anschließende Anfärbung durch Streptavidin – Phycoerythrin) markiert und im Anschluss durch entsprechende Scannern detektiert. Um unspezifische Bindungen während der Hybridisierung auf dem Trägermaterial zu unterbinden, wird dessen Oberfläche zunächst mit einem Hybridisierungspuffer behandelt. Der Prozess der Hybridisierung selbst erfolgt nach dem Prinzip der Watson – Crick Basenpaarung und ist vergleichbar mit der Renaturierung komplementärer DNA – Stränge. Viele Faktoren wie Temperatur, Salzkonzentration, Luftfeuchtigkeit, pH – Wert und das Vorhandensein organischer Lösungsmittel entscheiden über die Qualität des Hybridisierungsprozesses. Ein wichtiger Schritt nach der Hybridisierung ist das Waschen des Microarrays. Hierbei werden ungebundene Testmoleküle entfernt und die Stringenz des Experiments durch die Reduzierung von Kreuzhybridisierungen erhöht.

Auch wenn sich beide Technologien durch verbesserte Herstellungsverfahren zur Array Produktion in hoher Stückzahl eignen, so haben sich Affymetrix Chips doch als „Quasi – Standardverfahren“ für kommerzielle Anwendungen etablieren können. cDNA – Arrays sind zum einen durch die relativ großen Spotdurchmesser in der Probedichte limitiert und zum anderen unterliegen die Arrays zum Teil deutlichen Variationen. Bei Oligonukleotid – Microarrays müssen strenge Protokolle sowohl bei der Herstellung der Chips, als auch bei der Durchführung der Experimente eingehalten werden, wodurch ein direkter Vergleich mehrerer Experimente aus unterschiedlichen Laboratorien möglich wird. Die Herstellung der

bis zu 70 Masken pro Chip ist sehr aufwändig und kostenintensiv, das Design neuer Chips lohnt sich also für kleinere Versuchsreihen finanziell nicht. In diesem Bereich liegen die Vorteile der cDNA – Arrays, deren Herstellung sich sehr flexibel gestalten lässt. Zwei – Farben – Arrays können nur eine relative Genexpression messen, da die mRNA – Stränge auf dem Array um die Bindungsstellen konkurrieren. Mit Oligonukleotid – Microarray Chips lassen sich auch quantitative Genexpressionsunterschiede messen. Relativ neu sind Combimatrix CustomArrays™. Diese bieten die höchste Flexibilität im Bereich der kundenspezifischen Microarray Technologie. Combimatrix Arrays werden durch eine spezielle Semikonduktor – Technologie elektrochemisch bestückt und erhalten so kundenspezifische Designs von DNA – Sonden in höchster Qualität. Drei unterschiedliche Array Größen werden zur Zeit angeboten: 4x2K, 12K and 90K mit Oligonukleotidlängen bis zu 50mer. Zusätzlich sind vielfältige Katalog-Arrays zum Beispiel für Mensch, Maus, Ratte, *Drosophila*, *Arabidopsis*, Mais, und andere Organismen verfügbar. Alle CustomArrays™ können bis zu viermal ohne Qualitätseinbußen nach dem Strippen verwendet werden (www.combimatrix.com).

2.1.4 Herstellung

2.1.4.1 Trägersubstanzen

Als Trägersubstanzen für Microarrays werden Objektträger aus Glas, Nylon – / Nitrozellulose – Membranen (Saiki et al. 1989), Polyacrylamid beschichtetem Glas (Mitra & Church 1999) oder Polysterin (Nikiforo & Rogers 1995) verwendet. Glas hat den großen Vorteil, dass es sehr widerstandsfähig gegenüber hohen Temperaturen und chemischen Substanzen ist. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Eigenfluoreszenz von Glas, wodurch mögliche Hintergrundsignale minimiert werden. Für die Immobilisierung der Proben auf dem Glas stehen eine Reihe von Chemikalien zur Verfügung mit denen das Glas überzogen wird:

- Poly – L – Lysin: Ionische Bindung zwischen der negativ geladenen Phosphatgruppe der DNA und der positiv geladenen Amino – Schicht auf dem Glas
- Aldehyde: Kovalente Bindung des Aldehyds mit der primären Amino-Gruppe der DNA
- Epoxide: Auch zur Immobilisierung von Proteinen geeignet

2.1.4.2 Photolithografisches Verfahren / *in situ* Technik

Bei der *in situ* Synthese von Gen – Chips wird das photolithographische Verfahren (Abbildung 5) zur Herstellung der Oligonukleotide verwendet. Der DNA – Chip wird Nukleotid für Nukleotid aufgebaut, in jedem Arbeitszyklus wird eine der vier Basen (A C T G) hinzugefügt. Eine Schutzgruppe am 5' – Ende jeder Base verhindert die ungewollte Kopplung neuer Basen. Die Deprotektion geschieht selektiv. Mit Lochmasken (Affymetrix) oder der sogenannten Digital Micromirror – Technologie (NimbleGen, Febit) werden an bestimmten Stellen auf dem Chip durch Bestrahlung mit Licht die protektiven Gruppen in Hydroxyl – Gruppen umgewandelt und die DNA – Moleküle im darauf folgenden Schritt synthetisch verlängert. Nachdem die neu hinzugefügten Basen mit einer Schutzgruppe versehen worden sind, kann ein weiterer Synthese – Zyklus gestartet werden.

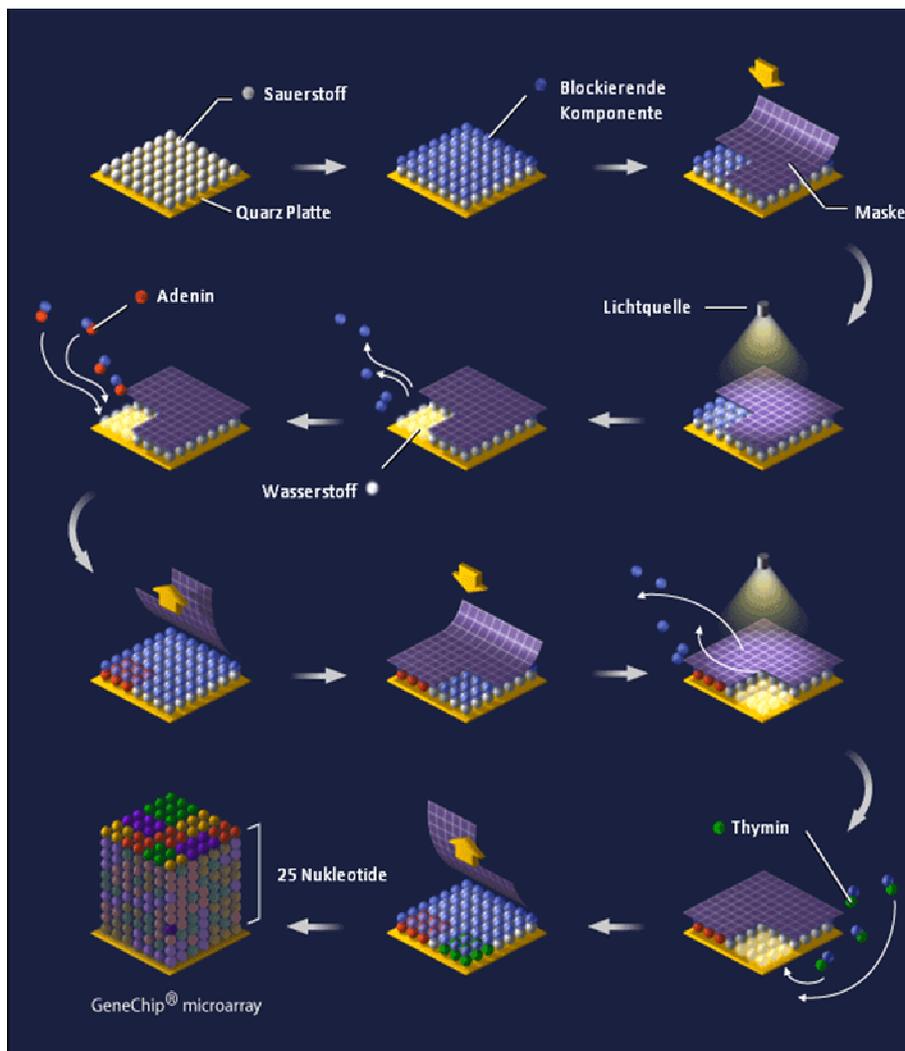


Abb. 5: Photolithografisches Verfahren zur Erstellung eines *in situ* Microarrays (Affymetrix)

Eine Einschränkung dieser Methode liegt in der Länge und Reinheit der DNA-Sonden. Photolithographische Verfahren erreichen eine Kopplungseffizienz p von ungefähr 98%. Bei einer Sequenzlänge s von 20 – 25 liegt die Ausbeute an korrekt synthetisierten Oligonukleotiden nach p_s bei ca. 65%. Da die Fehlerrate bei höherer Sequenzlänge zu groß wird, beschränkt sich Affymetrix auf Oligonukleotide der Länge von 25 Basen.

Mit dieser Methode können sehr hohe Probandichten erzeugt werden; kommerziell erhältliche Chips enthalten bis zu 900.000 Oligonukleotid – Spots pro cm^2 (Genome – Wide Human SNP Array 6.0 von Affymetrix). Jeder Spot kann aus mehreren Millionen Oligonukleotidsträngen bestehen. Die kurze Oligonukleotidlänge hat eine geringe Sensitivität zur Folge; aus diesem Grund muss sichergestellt sein, dass die gewählten Sequenzen repräsentativ für das zu untersuchende Gen sind und möglichst keine Homologien mit anderen Sequenzen auf dem Chip oder mit anderen Genen aufweisen. Nur dadurch kann eine hohe Spezifität gewährleistet werden. Im Unterschied zu DNA – Arrays, bei denen nur eine Sequenz pro Gen aufgetragen wird, sind es bei Gen – Chips 11 – 20 verschiedene Teilsequenzen eines Gens, die auf dem Chip synthetisiert werden.

2.1.4.3 Mechanisches Microspotting

Die ersten Microarrays wurden durch Spotting, also Auftropfen der Fängermoleküle auf ein Trägermaterial, hergestellt. Während dies zu Anfang noch per Hand geschah, übernehmen heute in der Regel Roboter diese Aufgabe. Eine Kassette (Abbildung 6) mit bis zu mehreren hundert Nadeln am Endeffektor (Hand) dieser Roboter ermöglicht das präzise Auftragen einer großen Anzahl von Molekülen pro Arbeitsschritt.

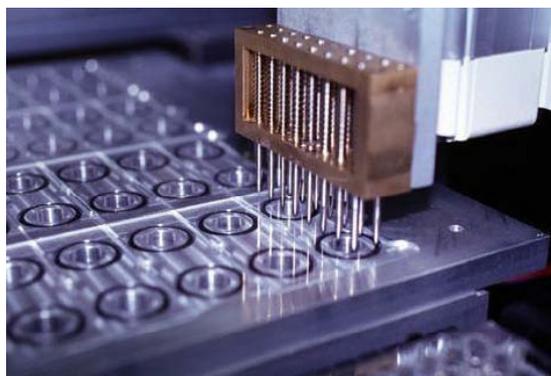


Abb. 6: Arrayer mit einer Kassette von 8 pins

Das Auftragen der Proben kann kontaktfrei oder über das *Pin – Printing –* Verfahren geschehen. Beim *Pin – Printing* wird die Probenlösung mit der Nadel eines Spotting – Roboters aufgenommen und ein kleiner Tropfen auf der Oberfläche abgesetzt. *Solid pins* haben ein flaches Endstück und können auch auf mit Nylon überzogenen Glasträgern verwendet werden. Ihr Nachteil besteht in einem relativ großen Spottdurchmesser und der Notwendigkeit nach jedem Spot neues Probenmaterial aufnehmen zu müssen.

Neuere Apparaturen verwenden entweder *quill pins*, Kapillaren mit Reservoir, das es ihnen ermöglicht bis zu 100 Spots pro Ladung zu setzen, oder *ring & pin*, eine Mischung aus den beiden vorigen Methoden, bestehend aus einem Ring, der ein Reservoir mit Probenlösung bereitstellt und einem Stempel, der durch dieses Reservoir fährt und Probenlösung auf das Trägermaterial aufbringt. Solche *Pin – Printer* erzeugen Tropfendurchmesser von 50 – 300 μm und setzen bis zu 384 solcher Spots auf einmal.

Kontaktfreies Drucken bedient sich des Funktionsprinzips von Tintenstrahldruckern (Inkjet – Verfahren). Hierbei werden aus einer Düse durch eine piezoelektrisch gesteuerte Pumpe kleine Flüssigkeitstropfen herausgeschossen. Diese Methode ist auf Grund der kontaktlosen Probenabgabe unabhängig von den Oberflächeneigenschaften des Trägermaterials und wesentlich präziser bzgl. des dosierten Probenvolumens, als die *Pin – Printing –* Verfahren. Durch erreichbare Spottdurchmesser von 25 – 100 μm lassen sich Arrays mit höherer Spottdichte herstellen, wodurch der Durchsatz erhöht und Probenmaterial gespart wird.

Ein Nachteil des *Pin – Printings* besteht in dem unmittelbaren Kontakt zur Trägeroberfläche durch den es zu einem sichtbaren Rand um die Spots kommen und die Oberfläche beschädigt werden kann. Des weiteren können durch den direkten Kontakt mit der Oberfläche ungleichmäßige Spots erzeugt werden, die ein Problem in der Auswertung darstellen können.

Die Inkjet – Technik hingegen setzt die DNA – Fragmente Temperaturen von bis zu 200 °C aus, die zu einer Beschädigung der DNA – Moleküle führen können. Ein weiterer Nachteil können die hohen Scherkräfte sein, welche die DNA – Moleküle oder den Druckkopf beschädigen könnten.

2.1.4.4 Gendatenbanken

Die Auswahl der Gene, respektive der Proben ist ein wichtiger Schritt beim Design von Microarrays. Jede aufgetragene Probe sollte genau ein Gen binden, d.h. jede Probensequenz sollte hochspezifisch für das entsprechende Ziel – Gen sein. Ist die Ähnlichkeit zwischen den aufgetragenen Sequenzen zu groß, besteht die Gefahr von Kreuzhybridisierungen, durch die Daten verfälscht werden können. Je nach Splicing – Muster können aus einem Gen einige wenige bis mehrere tausend Genprodukte entstehen (Black 2003). Es ist daher wichtig zu entscheiden, welche Teilsequenz für das entsprechende Experiment passend ist. Für die Auswahl der Proben werden in der Regel öffentliche Gen – Datenbanken wie UniGene, TIGR und RefSeq herangezogen. Dort finden sich zu den meisten Genen unterschiedliche Splicing – Varianten. Einen Großteil der hinterlegten Sequenzen sind “Expressed Sequence Tags“ (ESTs), kurze Sequenzen, denen allerdings häufig noch keine Proteinfunktion zugeordnet werden konnte.

2.1.5 Validierungsmethoden für Microarray Experimente

Experimente mit Microarrays enthalten zahlreiche potentielle Fehlerquellen, wie eine mögliche mRNA – Degradierung während der Präparation, unspezifische Hybridisierung oder schlechte RNA – Qualität. Weitere Fehlerquellen können bei der Herstellung der Objektträger im Labor auftreten (Sequenzen können aus Bibliotheken stammen, die bis zu 5 % fehlerhafte Annotationen haben). Aufgrund der hohen Kosten und der komplexen Datenauswertung sind Versuchswiederholungen bei Microarray Experimente meistens limitiert.

Dieser Umstand erfordert die Validierung der Microarray Genexpressionsdaten anhand alternativer Methoden, wie der quantitativen Real Time PCR (Bustin et al. 2000). Andere Methoden zur Validierung sind beispielsweise “Northern Blot“ Analysen, die *in situ* Hybridisierung (Parker und Barnes, 1999) und “RNase Protektion Assays“ (Hod 1992; Saccomanno et al. 1992).

Mit der weiten Verbreitung der Real Time Systeme in den letzten Jahren stieg auch die Zahl der Publikationen über die Anwendung der quantitativen Real Time PCR (zur Methodik siehe Punkt 2.2) stark an. Eines der wichtigsten Einsatzgebiete der quantitativen Real Time PCR (qRT – PCR) ist die Validierung der Daten von Microarray Analysen (Rajeevan et al. 2001).

Die entscheidenden Vorteile der qRT – PCR gegenüber anderen PCR basierter Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren sind der extrem große dynamische Bereich und der hohe Verlässlichkeitsgrad der Ergebnisse, da die Produktmenge nicht nur einmalig nach der PCR analysiert wird, sondern die Kinetik der gesamten Reaktion sichtbar wird (Higuchi et al. 1993). Abweichende Amplifikationseffizienzen in den individuellen Reaktionsansätzen lassen sich somit leicht identifizieren.

2.2 Real Time PCR

2.2.1 Prinzip und Technik

Die qRT – PCR stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR dar. Der wichtigste Unterschied besteht in der Möglichkeit, den Fortgang der DNA – Amplifikation der DNA noch während der Enzymreaktion (in Echtzeit – Real Time) nachzuweisen.

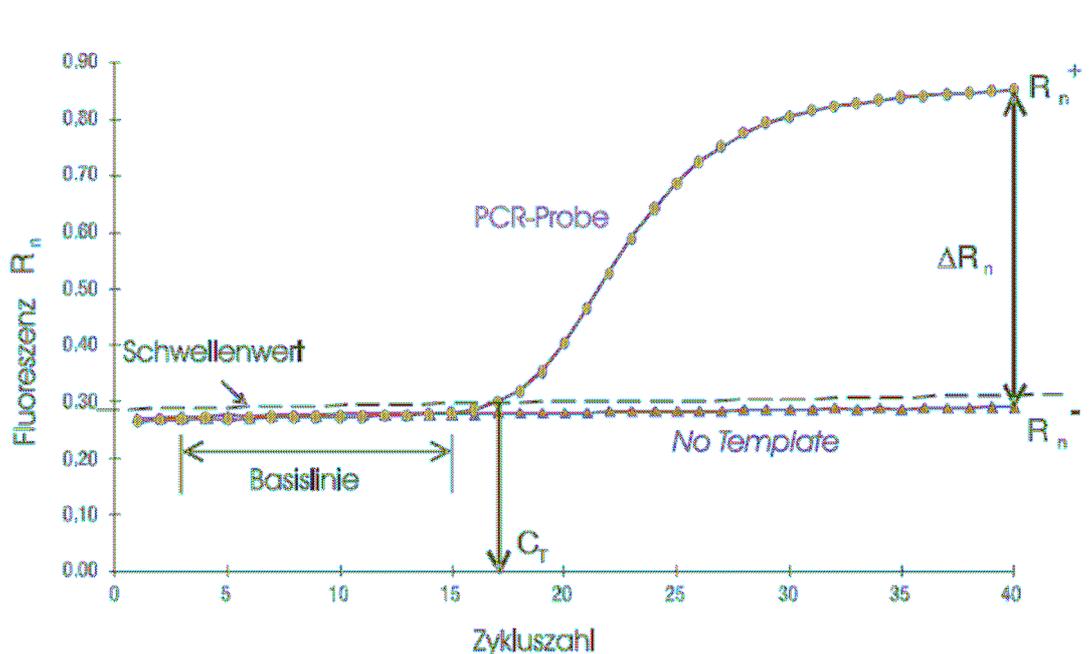


Abb. 7: Schematische Darstellung einer Amplifikationsgrafik: Die gemessene Fluoreszenz (Ordinate) wird gegen die Zykluszahl (Abszisse) der DNA Synthese aufgetragen. In den ersten Zyklen ändern sich die Fluoreszenzwerte nur unwesentlich, hier wird die Basislinie ("Baseline") definiert. Aus der Standardabweichung der Fluoreszenz zwischen Zyklus drei und 15 multipliziert mit dem Faktor zehn, wird ein Fluoreszenzwert errechnet, der zur Grundfluoreszenz der Proben addiert wird. So ergibt sich der Schwellenwert ("Threshold"). Der Schnittpunkt zwischen Amplifikationsgraph und Schwellenwert wird als C_T – Zykluszahl ("Cycle – Threshold") bezeichnet. Dieser markiert einen Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert. R_n^+ , R_n^- – normalisierte Fluoreszenz einer positiven, bzw. negativen Probe. ΔR_n entspricht der Basisline – korrigierten, normalisierten Fluoreszenz. Modifiziert nach Affymetrix (2003).

Dabei gibt es zwei unterschiedliche Techniken. Bei der einen werden interkalierende Farbstoffe, die sich in die doppelsträngige DNA einlagern (Higuchi et al. 1992; 1993) eingesetzt, und bei der anderen sequenzspezifische Oligonukleotide (Sonden), die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (Saiki et al. 1985; Sambrook et al. 1989). Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sonden auf dem Markt. Eine Übersicht bieten Bente (2003) und Bustin und Nolan (2004a). In der Abbildung 7 sind die Grundbegriffe der qRT – PCR erklärt. Weitere Informationen geben Bustin (2000, 2002) und Bustin und Nolan (2004c).

2.2.2 SYBR Green I

SYBR Green I gehört neben Ethidiumbromid zu den interkalierenden Farbstoffen. Die Besonderheit dieser Farbstoffe liegt in der Fähigkeit, unter UV – Licht, interkaliert in doppelsträngiger DNA, sichtbares Licht zu emittieren. So besitzt SYBR Green I eine Anregungswellenlänge von 497 nm und eine Emissionswellenlänge von 520 nm (Higuchi et al. 1992; 1993).

Die Leuchtkraft des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I ist in gelöster Form gering (Abbildung 8 A), erhöht sich aber drastisch in gebundener Form. Während der PCR – Reaktion beginnt nach der Anlagerung der Primer (Abbildung 8 B) die *Taq* – DNA – Polymerase mit der Kettenverlängerung, wobei zuerst wenige und danach immer mehr Fluoreszenzmoleküle in den entstehenden DNA Doppelstrang eingelagert werden (Abbildung 8 C).

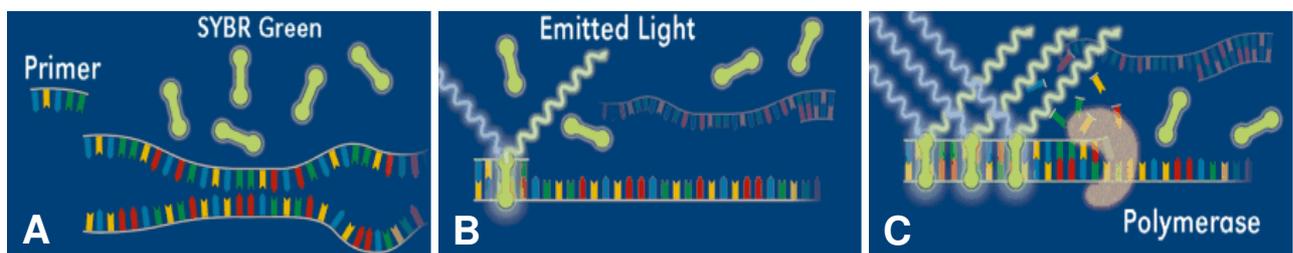


Abbildung 8: Prinzip der sequenzunabhängigen DNA – Detektion durch SYBR Green I; Quelle modifiziert: <http://www.gene-quantification.de>

Der Vorteil dieser Farbstoffe ist, dass sie universell einsetzbar sind (Bustin 2000), andererseits binden sie an jede doppelsträngige DNA, so dass auch unspezifische PCR – Produkte ein positives Signal emittieren (Vandesompele et al. 2002).

Aus diesem Grunde sollte am Ende einer SYBR Green I – PCR immer eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt werden (Ririe et al. 1997; Vandesompele et al. 2002). Dabei wird der Reaktionsansatz alle 30 sec. in 1 °C Schritten von ca. 60 °C auf ca. 95 °C erhitzt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Der Punkt, an dem die doppelsträngige DNA denaturiert, wird durch den Abfall der Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes gekennzeichnet. So kann für jedes PCR – Produkt ein spezifischer Schmelzpunkt bestimmt werden (Ririe et al. 1997). Eine Kontamination durch unspezifische Amplifikate kann durch das Auftreten unterschiedlicher Schmelzpunkte festgestellt werden.

2.2.3 Quantitative Real Time PCR

Die qRT – PCR wird z.B. bei Genexpressionsstudien eingesetzt (Bustin, 2000). Dabei wird der CT – Wert (s. Abbildung 4) als Bezugsgröße genutzt, da er sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an Nukleinsäure verhält (Higuchi et al. 1993). Die Quantifizierung kann relativ oder absolut erfolgen.

2.2.3.1 Absolute Quantifizierung

Die absolute Quantifizierung erlaubt eine relativ präzise Bestimmung der Kopienzahl oder der gesamten Nukleinsäurekonzentration. Als Ergebnis erhält man einen absoluten Zahlenwert mit einer Einheit (z. B. Kopienzahl, µg DNA). Die absolute Quantifizierung kann sowohl mit als auch ohne interne Kontrolle erfolgen. Die Quantifizierung ohne interne Kontrolle erfolgt anhand einer externen Standardkurve mit bekannten Konzentrationen an Kopienanzahlen (Bustin 2000; Pfaffl 2004). Als interne Kontrolle kann eine exogene DNA (oder RNA) verwendet werden, die jeder Probe hinzugefügt wird. Sie wird zusammen mit dem Zielgen amplifiziert und erlaubt so, falsch negative Ergebnisse zu erkennen.

2.2.3.2 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung erfolgt eine Quantifizierung der zu detektierenden Nukleinsäure relativ zu einem „Housekeeping Gene“ (HKG). Dabei werden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder -konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen (HKG) bezogen. Die Vorteile der Normalisierung

liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der Reversen Transkriptase innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das HKG betreffen. In den folgenden Berechnungen des Expressionsunterschiedes heben sich diese individuellen Probeneffekte wieder auf. GAPDH, die Gene für die rRNA der ribosomalen Untereinheiten (18S und 28S rRNA), Ubiquitin, Histon und α – oder β – Aktin sind wohl die am häufigsten verwendeten HKGs, die zur Normalisierung herangezogen werden (Bustin, 2000; Pfaffl, 2004).

2.2.4 PCR – Effizienz

Die Effizienz der PCR ist ein Maß für die Genauigkeit der Amplifikation eines PCR – Produktes innerhalb einer PCR – Reaktion. Sie ist von der Ausgangskonzentration der eingesetzten Nukleinsäure abhängig und entspricht der PCR – Kinetik durch folgende Formel:

$$N_n = N_0 \times E^n$$

$E = 2$ (theoretisch)

$E \neq 2$ (experimentell)

N_n = Nukleinsäure Endkonzentration

N_0 = Nukleinsäure Anfangskonzentration

E^n = PCR-Effizienz nach n Zyklen

Die Effizienz einer PCR hat theoretisch einen Wert von 2, da das PCR – Produkt nach jedem Zyklus unter optimalen Bedingungen verdoppelt vorliegt. Experimentell kann die Effizienz von diesem theoretischen Wert abweichen und muss deshalb für jedes Experiment neu bestimmt werden.

Einfluss auf die PCR – Effizienz haben unterschiedliche Faktoren wie die Ausgangskonzentration der Matrize, die Qualität der Nukleinsäure, die Dauer einer PCR – Reaktion, die Effizienz der DNA – Polymerase, die Nukleotid – und die $MgCl_2$ Konzentration, die Primersequenz und die Primerlänge, die Endkonzentration des PCR – Produktes sowie mögliche Pipettierfehler. Die PCR – Effizienz wurde in der Arbeit mit der Software „LinRegPCR“ (Ramakers et al. 2003) für jede PCR – Reaktion bestimmt.

2.2.5 Auswertung

Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den behandelten experimentellen Proben wird auf ein Kontrollprobenmaterial bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) kann über die sog. $\Delta\Delta\text{CT}$ – Methode oder über genauere Effizienz – korrigierte Modelle erfolgen. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der CT – Wert des Referenzgens vom CT – Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta\text{CT} = \text{CT Zielgen} - \text{CT Referenzgen}$). Nach dieser Normierung wird vom ΔCT Wert der experimentell behandelten Proben der ΔCT Wert einer Kontrolle abgezogen ($\Delta\Delta\text{CT}$); man kommt zum sog. $\Delta\Delta\text{CT}$ Berechnungsmodell. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak & Schmittgen 2001):

$$\Delta\text{CT} = \text{CT Zielgen} - \text{CT Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT Behandlung} - \Delta\text{CT Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{\Delta\Delta\text{CT}}$$

Dieses Berechnungsschema setzt eine Verdoppelung der DNA Menge in jedem Zyklus voraus. Man geht von einer optimalen Real Time PCR – Effizienz in allen Proben aus, was nicht der experimentellen Praxis entspricht. Die „wahre Real Time PCR – Effizienz“ dürfte sich unter optimierten Reaktionsbedingungen im Bereich von 1,7 bis 1,9 bewegen. Geringste Schwankungen in der Effizienz von Zielgen zu Referenzgen führen zu enormen Unterschieden in den Expressionsvergleichen. Deswegen sind Berechnungsmodelle entwickelt worden, die den unterschiedlichen Effizienzen in den experimentellen Proben Rechnung tragen. Ausgehend vom oberen $\Delta\Delta\text{CT}$ – Modell wurde das Effizienz – korrigierte relative Quantifizierungsmodell entwickelt (Pfaffl 2001).

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CT}_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CT}_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}$$

Das Berechnungsmodell setzt sich aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen Behandlung und Kontrolle im Zielgen im Zähler und aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes des Referenzgens im Nenner zusammen. Idealerweise ist das Referenzgen nicht reguliert und sowohl in der Behandlung als auch in der Kontrolle sind seine CT – Werte identisch, d.h. die CT – Werte heben sich in der Berechnungsformel auf. Der Nenner wird gleich eins, das Referenzgen fällt heraus und das berechnete Verhältnis ist nur von den Expressionsunterschieden des Zielgens abhängig.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CT}_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^0}$$

$$\text{Ratio} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CT}_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}$$

Berechnungssoftware “REST“

Hat man nun, wie üblich in einem wissenschaftlichen Experiment, mehrere zu testende Proben oder Wiederholungen, die behandelt wurden und weitere, welche als Kontrolle dienen, so kommt man mit dem oben beschriebenen relativen Modell ($n = 1$) nicht mehr weiter. Man muss sowohl die Gruppe der behandelten Proben als auch die Gruppe der Kontrollen zusammenfassen. Hierfür kann die Software “REST“ (= Relative Expression Software Tool) (Pfaffl et al. 2002) verwendet werden, mit der Expressionsunterschiede von zwei unterschiedlich großen Gruppen berechnet und statistisch ausgewertet werden können. Diese Software fasst die Gruppen als Mittelwerte zusammen und berechnet daraus die mittleren Expressionsunterschiede (R) der Gruppen, normalisiert über ein bestimmtes HKG, sowie die Varianzen der einzelnen Expressionen. Die Ergebnisse werden statistisch getestet und die Expressionsunterschiede werden in einem Ausgabefenster mit ihren Signifikanzniveaus ausgegeben. Die Statistik basiert auf einem sehr robusten und von einer Normalverteilung unabhängigen Randomisierungstest, bei dem beliebig viele tausend Randomisierungen und Wiederholungen durchgeführt werden können (Pfaffl et al. 2002).

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CT}_{\text{Zielgen}}(\text{Mittelwert}_{\text{Kontrolle}} - \text{Mittelwert}_{\text{Behandlung}})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CT}_{\text{Zielgen}}(\text{Mittelwert}_{\text{Kontrolle}} - \text{Mittelwert}_{\text{Behandlung}})}}$$

3 Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Reagenzien & Enzyme

Tab. 1: Chemikalien (Reinheit mindestens p.a. falls nicht anders angegeben)

Chemikalie	Hersteller/Bezugsquellen
Aceton	Merck (Darmstadt)
low electroendosmosis (LE) Agarose	Biozym (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Chloroform	VWR (Darmstadt)
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Serva (Heidelberg)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma – Aldrich (Traufkirchen)
DNaseZAP [®]	Ambion (Frankfurt)
Nukleosidtriphosphate (dNTPs)	Axon (Kaiserslautern)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Tritiplex [®] , p.a.	Merck (Darmstadt)
Essigsäure, 99 – 100 %, p.a. (Eisessig)	Merck (Darmstadt)
Ethanol absolut	VWR (Darmstadt)
Ethidiumbromidlösung, 1%	VWR (Darmstadt)
Formaldehydlösung, 37%	VWR (Darmstadt)
Formamid	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	Becton, Dickinson (Heidelberg)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma – Aldrich (Traufkirchen)
Isoamylalkohol	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Sigma – Aldrich (Traufkirchen)
“Lichrosolv“ H ₂ O	VWR (Darmstadt)
Lithiumchlorid, wasserfrei	Sigma – Aldrich (Traufkirchen)
2 – Mercaptoethanol	Sigma – Aldrich (Traufkirchen)
Magnesiumchlorid	PeqLab (Erlangen)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
pH – Meter Pufferlösungen 7,0 & 9,0	Riede – de Haën (Seelze)
Polyvinylpyrrolidon (PVP) (K 30)	Sigma – Aldrich (Traufkirchen)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
RNAseZAP [®]	Sigma – Aldrich (Traufkirchen)
Salzsäure, 32%	Merck (Darmstadt)
Spermidin	Serva (Heidelberg)
“super optimal broth with glucose“ (SOC) – Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Ultra Pure	Sigma – Aldrich (Traufkirchen)
Trypton	Becton, Dickinson (Heidelberg)
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X – Gal)	Sigma – Aldrich (Traufkirchen)

Tab. 2: Enzyme

Enzyme	Hersteller/Bezugsquelle
DNAse I	Qiagen (Hilden)
EcoR I	NEB (Frankfurt)
Hind III	NEB (Frankfurt)
RNAse I	Qiagen (Hilden)
Taq – DNA – Polymerase	PeqLab (Erlangen)

3.1.2 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten PCR – und Sequenzierprimer wurden von Metabion (*Martinsried*) im Auftrag synthetisiert. PCR – Primer wurden in Standard Qualität hergestellt, Sequenzierprimer HPLC aufgereinigt. Alle Primer für die quantitative Real Time PCR wurden mit der Software “Primer Express“ von Applied Biosystems (*Darmstadt*) entwickelt. Die Sequenzierprimer wurden mit “VectorNTI“ von Invitrogen (*Karlsruhe*) entwickelt. Die eigentlichen Primersequenz wurde jeweils um die Sequenz des Universalprimers M13, aus gleichnamigen Phagen synthetisiert, verlängert, um für die spätere Sequenzierung jeweils nur einen 5´– 3´ (5´– **TGT AAA ACG ACG GCC AGT** – 3´) und einen 3´– 5´ Primer (3´– **CAG GAA ACA GCT ATG ACC** – 5´) zu benötigen. Im folgenden sind alle verwendeten Primer mit Namen, Sequenz und der Größe des erwarteten Amplifikats aus der genomischen DNA der Weinrebe aufgelistet.

3.1.2.1 Primer ”Housekeeping Genes“ für quantitative Real Time PCR

SAND: 5´– CAA CAT CCT TTA CCC ATT GAC AGA – 3´
3´– GAA TAG ACG TTC ACC TAG TTT ACG – 5´

Amplifikat: 76 bp

UBC: 5´– GAG GGT CGT CAG GAT TTG GA – 3´
3´– GAA TTT CTA CCA TTC ACG TCC CG – 5´

Amplifikat: 75 bp

α – Tubulin: 5´– CAG CCA GAT CTT CAC GAG CTT – 3´
3´– ATA CCA GTT ACG CGC TCT TG – 5´

Amplifikat: 119 bp

Actin: 5´– CTT GCA TCC CTC AGC ACC TT – 3´
3´– AGG TAG GTA ACA GGT GTC CT – 5´

Amplifikat: 82 bp

GAPDH: 5´– TTC TCG TTG AGG GCT ATT CCA – 3´

- 3' – ACA GTG GCT ACT TCA GAC ACC – 5'
Amplifikat: 70 bp
- EF – α 1: 5' – AAC CAA AAT ATC CGG AGT AAA AGA – 3'
3' – ACT GTT ACT GTT TCC TTT TCG TTT – 5'
Amplifikat: 80 bp
- 18S: 5' – GGG CAT TCG TAT TTC ATA GTC AGAG – 3'
3' – TCC TAC AAA AGT AAT TAC TTC TTG GC – 5'
Amplifikat: 80 bp
- L2: 5' – GGC TTG AGA TCA AAC GAA GGA T – 3'
3' – TCT TGT TAC GCA ACC TCC GA – 5'
Amplifikat: 80 bp
- MDH: 5' – CCA TGC ATC ATC ACC CAC AA – 3'
3' – CCA AAA CTG TCA TCG TAC CAA CTG – 5'
Amplifikat: 72 bp

3.1.2.2 Primer für die Kandidatengene aus der Microarray Analyse

- PKSF1: 5' – GCC TTC CTG CCA ATT AGG TTT T – 3'
3' – CTA ACT TCA GGT TCT TCG ATC CGA – 5'
Amplifikat: 67 bp
- WRKY1: 5' – CTC GAT CTG ATG CGA ATG CA – 3'
3' – AGG AAG CAG AAA ACT ATC CGC – 5'
Amplifikat: 65 bp
- RHG1: 5' – CAA AAT CGG GTG CTT CAT GTT – 3'
3' – TAG AAG AGA GTC CGG ACA CGG – 5'
Amplifikat: 62 bp
- TCP2: 5' – GAG GCA ACA GAG ACG GAG AAT – 3'
3' – AAC TTT GGT CGT TCC GGC – 5'
Amplifikat: 59 bp
- ZIB1: 5' – CAA GGG CTC AGC AGC CTT T – 3'
3' – CAT CTT ACA GCC GAC ACC ACT C – 5'
Amplifikat: 59 bp
- bZip: 5' – GGC TTG AGA TCA AAC GAA GGA T – 3'
3' – TCT TGT TAC GCA ACC TCC GA – 5'
Amplifikat: 59 bp
- CB002795: 5' – GGA AGC AGA AGG CTC AAA GAA G – 3'
3' – CTT TTA CGG TAG TAA TCC CGG – 5'
Amplifikat: 67 bp
- CB341658: 5' – GTG ATT CCA CAA GAC CCC AAA – 3'

- 3' – AAG TGT AGC ACC CAG TAG AGG – 5'
Amplifikat: 68 bp
- CB341760: 5' – TGA GGG CAA ATGTGG TGT AGA A – 3'
3' – AAG TTA GGT CTG AGG TTA AGG T – 5'
Amplifikat: 67 bp
- CD009416: 5' – GAG TCT TTG TGC GAG CCG TAT – 3'
3' – CCA TTG CTC CCC CCA AGC – 5'
Amplifikat: 58 bp
- CD721663: 5' – CAA CCC CGA CAT CCT TGA ATA – 3'
3' – TAT CCC CTC ATG CGC CCA AC – 5'
Amplifikat: 63 bp
- CF202148: 5' – CCC ACA GCT TCG GCA GAT – 3'
3' – GTT CTC GCG AGC TAG TCA CTC – 5'
Amplifikat: 63 bp
- CF203567: 5' – CTC CGT TGT CGC TGA ATG AG – 3'
3' – AGA TCG TTT AGC CTT TTC GGG – 5'
Amplifikat: 63 bp
- CF203581: 5' – CAA GCT AAA CCC AAA AGA TTC CC – 3'
3' – TAA AAA CCT CAG GCA AAC GC – 5'
Amplifikat: 80 bp
- CF204825: 5' – GTT TTC GGC ATC ACA ATG CA – 3'
3' – TTT TGG TGC GAA AGG GAT CCT – 5'
Amplifikat: 68 bp
- CF214472: 5' – GCC TCC AAT TGC CAT AAA TGA A – 3'
3' – ACG TTT ATA CTC CAT ACG CCA G – 5'
Amplifikat: 77 bp
- CF512412: 5' – TCC AGG GAG TGA ATG GAA CCT A – 3'
3' – TCA GTT AAA GCC TCG CCT CT – 5'
Amplifikat: 68 bp
- CF512494: 5' – CAC GTA GGT TTG TTT TGC ATCTTG – 3'
3' – AAT GTG ATC GGT ACC AAA CGG T – 5'
Amplifikat: 82 bp
- CF512751: 5' – CAC TTC CCC ACT GAC TCA ATC A – 3'
3' – AAT TGA AGC CTC ACC GTT CGT – 5'
Amplifikat: 66 bp
- CF513596: 5' – CTT TGG CTC GGC TTT CGA – 3'
3' – AGT TAC TAA CGG AAC CGG AA – 5'
Amplifikat: 60 bp

3.1.2.3 Abgeleitete Primer für die Kandidatengene aus der Literatur

- BLIND: 5'– GCC CAT GGT CAC CTG AAG A – 3'
3'– CTC TTT ATA CCC TGA CCC CCT – 5'
Amplifikat: 65 bp
- LAS: 5'– TAT GAG GCC TGC CCC TAC CT – 3'
3'– GGT TAG TTC GGT AGG AGC TC – 5'
Amplifikat: 59 bp
- CLV1: 5'– CAC CAT GAG AGA GGT GGT TCA C – 3'
3'– GTC TTA CGA GGT TCG GAG TAG – 5'
Amplifikat: 63 bp
- CLV2: 5'– CCT GCC AGG ATT GGT AAT TTG – 3'
3'– AGA AAG GGT GTT GAG CGA AAG – 5'
Amplifikat: 61 bp
- ER: 5'– CGT CTC ACG GAA AAG TCT GAT G – 3'
3'– GAA CTC GAC GCA TGA CCT TCC – 5'
Amplifikat: 66 bp
- KNAT1: 5'– GAA GTG CGA GGG TGT TGG TT – 3'
3'– CCT TTG ACT TGA AGG ACT CTA ACT AC – 5'
Amplifikat: 76 bp
- LSN: 5'– TGC ACA GCT CAG GAT TTC TTG A – 3'
3'– GGT TTC CCC TGA AGG ACT CG – 5'
Amplifikat: 67 bp
- MAX1: 5'– GTC AAA CCG GGA CAC TTG CT – 3'
3'– TCG AAG GTA TAG AGG CGT CAC – 5'
Amplifikat: 67 bp
- MAX2: 5'– GCC ATT TGG GCT GAG TTC TC – 3'
3'– CAG TTT CTA CTT CAA CCT AAC ACC – 5'
Amplifikat: 65 bp
- MAX3: 5'– TGT CGT ATG TGC ACG ATG AGA A – 3'
3'– AAC CAC TAC CTA CGG TTC TGA – 5'
Amplifikat: 63 bp
- REV: 5'– GTC GAG GCT CTG GAA CGA GT – 3'
3'– AAG AGA AGC CGC CGT CG – 5'
Amplifikat: 60 bp
- STM: 5'– GGC CTG GAT CAG AAG CAA ATA A – 3'
3'– TTC CTT CGC CGT GAC CTT CG – 5'
Amplifikat: 60 bp
- SPS: 5'– CCA AAA CTC CCC TAC CTG GAA – 3'
3'– TTC GTG GGT AGT CAC GGT G – 5'
Amplifikat: 63 bp

SUP: 5'– CAT GGC CTC CAA GAT CTT ATA CAT G – 3'
3'– TTA AGT CTA GAC GGG TTC GAG A – 5'

Amplifikat: 63 bp

TB1: 5'– GCA GGT TTG TGC CAA ATG G – 3'
3'– GCT TAA GTC CCA CTC CTC CT – 5'

Amplifikat: 63 bp

3.1.2.4 Sequenzierprimer (inklusive der M13 – Universalsequenz)

bZIP: 5'– **TGT AAA ACG ACG GCC AGT** TCT TCA AGT TTC CAC TAC AAA GTG T – 3'
3'– CCT CGC CAA CTA CTC TTC TTC **CAG TAT CGA CAA AGG AC** – 5'

Amplifikat: 1000 bp

SPS: 5'– **TGT AAA ACG ACG GCC AGT** ATT CAC CAT GCT CCT CCA AG – 3'
3'– CGA AAG GAA CGT AAA GGA GTC **CAG TAT CGA CAA AGG AC** – 5'

Amplifikat: 979 bp

LAS: 5'– **TGT AAA ACG ACG GCC AGT** CCA CTG TCC ACC ATG TCC TT – 3'
3'– TTC CAC TTC TCC CCA GCA GAC **CAG TAT CGA CAA AGG AC** – 5'

Amplifikat: 963 bp

REV: 5'– **TGT AAA ACG ACG GCC AGT** TCA TTC TTC GCT TTC TCG CT – 3'
3'– ACA GGT TTC GGG TCA AGA GAC **CAG TAT CGA CAA AGG AC** – 5'

Amplifikat: 999 bp

ER: 5'– **TGT AAA ACG ACG GCC AGT** GTG GTC ATT TTA TGA AGC CCT – 3'
3'– CGG GTG AAC TGA AGG AAA ACC **CAG TAT CGA CAA AGG AC** – 5'

Amplifikat: 992 bp

STM: 5'– **TGT AAA ACG ACG GCC AGT** CGG TGA ACA AAT TGT CGC TA – 3'
3'– GGT AAC GGT GGA AGA CTC AAC **CAG TAT CGA CAA AGG AC** – 5'

Amplifikat: 882 bp

Universalsequenzierprimer T3: 5'– **AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG** – 3'

Universalsequenzierprimer T7: 5'– **TAA TAC CAG TCA CTA TAG GG** – 3'

3.1.3 Plasmid

Für die Klonierungsarbeiten wurde das Plasmid pCR[®]4 – TOPO[®] von Invitrogen (Karlsruhe) als Vektor benutzt. Die Vektorkarte ist in Kapitel 3.2.7.2.1 abgebildet.

3.1.4 Bakterienstämme

Bakterien	Hersteller/Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> One Shot [®] DH5 α [™]	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Escherichia coli</i> One Shot [®] TOP 10	Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.5 Geräte, Kits & Zubehör

Tab. 3: Geräte, Kits & Zubehör

Produkt	Hersteller/Bezugsquelle
Zentrifugation	
Tischzentrifugen Biofuge A & Pico	<i>Heraeus (Hanau)</i>
Zentrifuge 2K15, 4K15	<i>Sigma (Osterode am Harz)</i>
Rotoren: Sigma: 12148, 12139, 12145, 12666	<i>Sigma (Osterode am Harz)</i>
Qiagen/Sigma: 09100	<i>Qiagen (Hilden)</i>
Gelelektrophorese	
Spannungsquelle: Phero-STAB 0652	<i>Biotec – Fischer (Reiskirchen)</i>
EC105	<i>E – C – Apparatus Corporation</i>
Kammern: Midicell EC 350	<i>E – C – Apparatus Corporation</i>
Minicell Submarine	<i>Biotech Fischer (Reiskirchen)</i>
Kämme und Gelträger	<i>Biometra (Göttingen)</i>
	<i>Biotech Fischer (Reiskirchen)</i>
Spektroskopie/ -metrie	
LKB Biochrom Ultraspec II	<i>Pharmacia Biotech (Freiburg)</i>
Nanophotometer™	<i>Implen (München)</i>
LabelGuard™ Microliter Cell, Lid 10, 50	<i>Implen (München)</i>
REAL TIME PCR	
7500 Fast Real Time PCR System	<i>Applied Biosystems (Darmstadt)</i>
Computer Optiplex Gx 280	<i>Dell (Frankfurt)</i>
Geldokumentation	
Vertikalschüttler Modell Kühner	<i>B. Braun (Melsungen)</i>
Computer bluechip	<i>Bluechip (Meuselwitz)</i>
Dunkelhaube DH – 30/32	<i>Biostep (Jahnsdorf)</i>
Transilluminator Bio View UST – 20M – 8E	<i>Biostep (Jahnsdorf)</i>
Diverses	
Abzug	<i>Asecos (Gründau)</i>
Autoklav 5050 ELVC	<i>Tuttnauer Systec (Wettenberg)</i>
Brutschrank B 20	<i>Heraeus (Hanau)</i>
Computer Optiplex GX 620	<i>Dell (Frankfurt)</i>
Drucker 5110cn	<i>Dell (Frankfurt)</i>
Drucker LaserJet 2420 d	<i>HP (Böblingen)</i>
GeneAmp PCR System 9700 Thermocycler	<i>Applied Biosystems (Darmstadt)</i>
Heißluftsterilisator FED 420	<i>Binder (Tuttlingen)</i>
H ₂ O – Deionisationsanlage Pure Lab Plus	<i>USF Seral (Ransbach-Baumbach)</i>
Inkubationshaube Certomat® H	<i>B. Braun Biotech (Melsungen)</i>
Kühlschrank	<i>Bauknecht (Stuttgart)</i>

Tab. 3: Geräte, Kits & Zubehör (Fortsetzung)

Produkt	Hersteller/Bezugsquelle
Mikrowelle Micromat	AEG (Nürnberg)
pH – Meter Elektrode 662 – 1790	VWR (Darmstadt)
Stromgerät pH – Meter	WTW (Weilheim)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Tiefkühltruhe	Kryotec (Hamburg)
Tischschüttler Certomat® R	B. Braun Biotech (Melsungen)
Vortex – 2 Genie	Scientific Industries (USA)
Waage Precision Advanced	OHAUS (Giessen)
Wärmeplatten/Magnetrührer RCT & RCO	JKA (Staufen)
Wasserbad MP 5	Julabo (Seelbach)
Wasserbad U3	Julabo (Seelbach)
Pipetten	
Kolbenhubpipetten	
Pipetman: 0,2 – 2 µl; 0,5 – 10 µl; 2 – 20 µl; 20 – 100 µl; 30 – 200 µl & 200 – 1000 µl	Gilson (Limburg)
Mehrkanal – Research – Pipette 0,5 – 10 µl	Eppendorf (Hamburg)
Finnpipette, 5 ml	Labsystems (Helsinki)
Material	
Alu – Folie	VWR (Darmstadt)
Autoklavierband	VWR (Darmstadt)
Drigalski – Spatel	VWR (Darmstadt)
Glasflaschen mit Schraubdeckel (50, 100, 250, 1000 & 2000 ml)	Schott (Jena)
Handschuhe Latex	Diagonal (Münster)
Magnetrührer Standard Set	neoLab (Heidelberg)
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plates	Applied Biosystems (Darmstadt)
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems (Darmstadt)
Mörser & Pistille	VWR (Darmstadt)
Parafilm	VWR (Darmstadt)
Petrischalen, 9 cm Durchmesser	VWR (Darmstadt)
Pipettenspitzen D10, D200 & D1000	Gilson (Limburg)
Polypropylen Mikroreaktionsgefäße 0,2 ml	ABgene (Hamburg)
Polypropylen Mikroreaktionsgefäße (0,5; 1,5 & 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Polypropylen Zentrifugenröhrchen (15 & 50 ml)	VWR (Darmstadt)
Polypropylenbecher mit Schraubdeckel (28 und 50 ml)	Sigma (Osterode)
Quali – PCR – Platten	Kisker (Steinfurt)
TipOne® Pipettenspitzen	StarLab (Ahrensberg)
Ultravette Mikro, Zentrumshöhe 15 mm	VWR (Darmstadt)

Tab. 3: Geräte, Kits & Zubehör (Fortsetzung)

Produkt	Hersteller/Bezugsquelle
Kits	
7500 Fast Real Time PCR Systems Spectral Calibration Kit I	<i>Applied Biosystems (Darmstadt)</i>
7500 Fast Real Time PCR Systems Spectral Calibration Kit II	<i>Applied Biosystems (Darmstadt)</i>
DNeasy Plant Mini Kit	<i>Qiagen (Hilden)</i>
Gene Set™ Plasmid Miniprep Kit	<i>Fermentas (Leon – Rot)</i>
GeneAmp Carry – Over Prevention Kit	<i>Applied Biosystems (Darmstadt)</i>
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	<i>Applied Biosystems (Darmstadt)</i>
InnuPREP Plant RNA Kit	<i>Analytika Jena (Jena)</i>
MinElute® Gel Extraktion Kit	<i>Qiagen (Hilden)</i>
Invisorb® Spin Plant RNA mini Kit	<i>Invitex (Berlin)</i>
MinElute® PCR Purification Kit	<i>Qiagen (Hilden)</i>
NucleoSpin® RNA Kit	<i>Macherey – Nagel (Düren)</i>
Power SYBR® Green PCR Master Mix	<i>Applied Biosystems (Darmstadt)</i>
Pure Yield™ Plasmid Miniprep Kit	<i>Promega (Mannheim)</i>
QIAGEN Plasmid Mini Kit	<i>Qiagen (Hilden)</i>
RNase – Free DNase Set	<i>Qiagen (Hilden)</i>
RNeasy MinElute Cleanup Kit	<i>Qiagen (Hilden)</i>
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	<i>Invitrogen (Karlsruhe)</i>
UltraClean™ Plant RNA Isolation Kit	<i>MoBio (Carlsbad, USA)</i>

3.1.6 Software

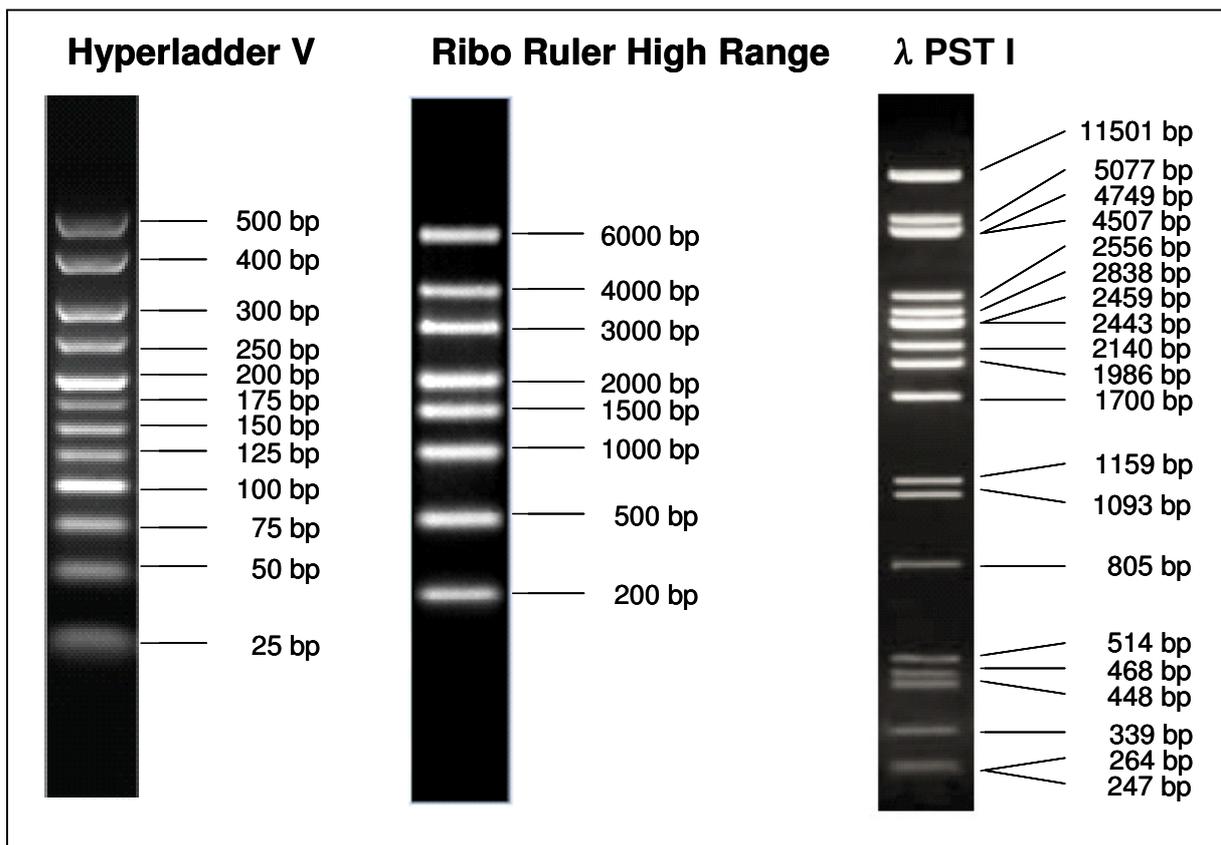
Tab. 4: Software

Produkt	Bezugsquelle
Frei verfügbare Software	
GrapePLEXdb/BarleyBase	<i>www.plexdb.org</i>
BestKeeper® Software (Pfaffl et al. 2004)	<i>www.Gene-Quantification.com</i>
geNorm (Vandesompele et al. 2002)	<i>www.Gene-Quantification.com</i>
REST 2005 (Pfaffl et al. 2002)	<i>www.Gene-Quantification.com</i>
National Center for Biotechnology Information	<i>www.ncbi.nlm.nih.gov</i>
BioEdit version 7.0.5.3 (Hall 1997)	<i>www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html</i>
R version 2.4.1	<i>www.r-projeCT.org</i>
Tinn – R 1.19.2.3 (Faria et al.2001)	<i>www.sciviews.org/Tinn-R/</i>
GeneChip® Operating Software	<i>Applied Biosystems (Darmstadt)</i>
Genscan	<i>www.genes.mit.edu/GENSCAN.html</i>
123 Genomics	<i>http://123genomics.com/files/analysis.html</i>
Vector NTI 10	<i>Invitrogen (Karlsruhe)</i>
Software	
7500 Fast System SDS 1.3.1	<i>Applied Biosystems (Darmstadt)</i>
Primer Express 3.0	<i>Applied Biosystems (Darmstadt)</i>
PVC 5.2.2.2	<i>Implen (München)</i>
Excel, Word, PowerPoint, Access 2003	<i>Microsoft (Redmond,USA)</i>
Argus X1 5.2.1	<i>Biostep (Jahnsdorf)</i>

3.1.7 Größenstandards

Tab. 5: Standards

Produkt	Hersteller/Bezugsquelle
DNA – Standard Hyperlader V, 100 bp	Bioline (Luckenwalde)
RiboRuler High Range RNA Ladder	Fermentas (Leon – Rot)
λ PST I	Fermentas (Leon – Rot)



3.1.8 Pflanzenmaterial für die Genexpressionsstudien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Pflanzenmaterial von verschiedenen *Vitis vinifera* Sorten für Genexpressionsstudien verwendet, die im Bezug auf die Merkmalsausprägung „Struktur des Fruchtstandes“ große phänotypische Unterschiede aufweisen. Das Pflanzenmaterial wurde von der Forschungsanstalt Geisenheim (Gm) sowie vom Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof (Gf) in Siebeldingen und vom Weinbaubetrieb Antes in Heppenheim (Hm) zur Verfügung gestellt. Die Versuchsfelder mit den verschiedenen Klonen der einzelnen Rebsorten im Fachgebiet Rebenzüchtung der Forschungsanstalt Geisenheim, des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof in Siebeldingen und des Weinbaubetriebs Antes werden nach den Regeln guter weinbaulicher Praxis

gepflegt. Im einzelnen handelt es sich um Pflanzenmaterial der Sorten `Spätburgunder`, `Chardonnay`, `Grauburgunder` und der sehr lockerbeerigen, großtraubigen Tafeltraube `Cardinal` (Tabelle 6)

Tab. 6: Verwendetes Pflanzenmaterial für die Genexpressionsunterschiede: Aufgelistet sind die Klone, die Struktur ihres Fruchtstandes und die Jahre (2006, 2007, 2008) und Standorten (Gm = Geisenheim; Hm = Heppenheim; Gf = Geilweilerhof) der Beprobung.

Sorte	Klon	Struktur	06 Gm	06 Gf	07 Gm	07 Hm	08 Gm	08 Hm
`Spätburgunder`	18 Gm	kompakt	x		x	x	x	x
`Spätburgunder`	1–84 Gm	locker	x		x	x	x	x
`Chardonnay`	54 Gm	kompakt			x		x	
`Chardonnay`	1–45 Gm	locker			x		x	
`Grauburgunder`	1–30 Gm	locker			x		x	
`Spätburgunder`	INRA 777	kompakt			x	x	x	x
`Spätburgunder`	M 242	locker				x		x
`Cardinal`	`Cardinal`	locker		x				
`Spätburgunder`	`Frank Classic`	kompakt		x				
`Spätburgunder`	`Frank Charisma`	locker		x				
`Spätburgunder`	20 –13 Gm	mischbeerig		x				

3.1.8.1 Auswahl des Pflanzenmaterials 2006

Im Jahr 2006 wurden die beiden `Spätburgunder`– Klone 18 Gm und 1–84 Gm am Standort Geisenheim beprobt. Der Klon 18 Gm besitzt bekanntermaßen kurze Beerensielchen, und bildet somit kompakte Trauben. Im Gegensatz dazu bildet der Klon 1–84 Gm längere Beerensielchen, wodurch die Fruchtstände lockerer aufgebaut sind. Am Standort Siebeldingen wurden die `Spätburgunder`– Klone 20–13 Gm, `Frank Classic` und `Frank Charisma` beprobt (siehe Abbildung 9). Der Klon 20–13 Gm bildet mischbeerige Fruchtstände aus, d. h. es sind sowohl große als auch kleine Beeren an einer Traube. In der Literatur wird dieser Klon auch als kleinbeerig beschrieben, aber mit einer lockeren Traubenstruktur. Der Klon `Frank Classic` bildet kleinere Beeren aus und besitzt eine sehr gute Botrytisfestigkeit bei einem ausgezeichneten Mostgewicht. Die Besonderheit bei diesem Klon besteht darin, dass die Kleinbeerigkeit und Lockerheit der Trauben oft erst ab dem 3. Ertragsjahr charakteristisch in Erscheinung treten.



Abb. 9: Die beprobten `Spätburgunder`- Klone in der Vegetationsperiode 2006 von links nach rechts: der kompakte Klon 18 Gm, der lockerbeerige Klon 1–84 Gm, der mischbeerige Klon 20–13 Gm, der Klon Frank Classic und der Klon Frank Charisma. (Fotos: E. Schönhals, R. Antes)

Der Klon `Frank Charisma` ist ein relativ junger Klon, der eine sehr schlanke Traube mit stärker ausgeprägter Lockerbeerigkeit, als der Klon `Frank Classic` ausbildet. Zusätzlich wurde Pflanzenmaterial der Tafeltraubensorte `Cardinal` als Referenz untersucht. Die Architektur der Trauben besteht aus einer sehr langen Rachis = Hauptachse und aus sehr langen Blütenstielchen, wodurch große, sehr lockerbeerige Trauben ausgebildet werden.

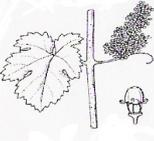
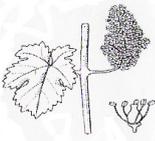
3.1.8.2 Phänotypische Beobachtung 2006

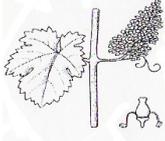
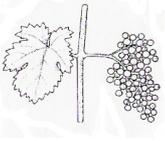
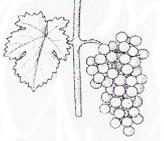
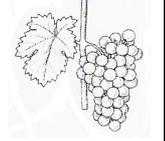
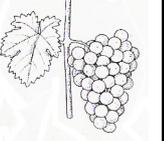
In den Anlagen der beiden `Spätburgunder`- Klone 18 Gm und 1–84 Gm in Geisenheim wurden je vier Einzelstöcke ausgesucht, an denen die phänologische Entwicklung dokumentiert werden sollte. Ab dem Austrieb wurden im wöchentlichem Abstand an diesen Einzelstöcken je ein repräsentativer Blütenstand (später die Traube) von Elske Schönhals im Verbundprojekt fotografiert. Durch die fotografische Dokumentation sollen mögliche phänotypische Unterschiede zwischen den beiden Klonen erfasst werden (siehe Kapitel 4.1).

3.1.8.3 Probennahme 2006

Um die Zeitpunkte für die Probennahme von Pflanzenmaterial klar zu definieren, wurde die BBCH Skala (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft) zur einheitlichen Beschreibung von Entwicklungsstadien bei Kultur- und Unkrautarten verwendet. Die Kurzbezeichnung BBCH leitet sich ab von Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bundessortenamt und Chemische Industrie. Diese Skala ist in Makro- und Mikrostadien unterteilt.

Tab. 7: Probennahmezeitpunkte für differenzielle Genexpressionsuntersuchungen

BBCH Stadium	53	55	57	61	65
					
Mikrostadium	Gescheine (Infloreszenzen) deutlich sichtbar	Gescheine (Infloreszenzen) vergrößern sich; Einzelblüten sind dicht zusammen gedrängt	Gescheine (Infloreszenzen) sind voll entwickelt; Einzelblüten spreizen sich ab	Beginn der Blüte: 10% der Blütenköppchen sind abgeworfen	Vollblüte: 50% der Blütenköppchen sind abgeworfen
Makrostadium	Erscheinen der Blütenanlage			Blüte	
Tag der Probenahme	11.05.2006	29.05.2006	13.06.2006	15.06.2006	16.06.2006

BBCH Stadium	69	73	77	81	85
					
Mikrostadium	Ende der Blüte	Beeren schrottkorngross; Trauben beginnen sich abzusenken	Beginn des Traubenschlusses	Beginn der Reife; Beeren beginnen hell zu werden (bzw. sich zu verfärben)	Weichwerden der Beeren
Makrostadium	Blüte	Fruchtentwicklung		Frucht- und Samenreife	
Tag der Probenahme	20.06.2006	23.06.2006	30.06.2006	11.08.2006	22.08.2006

Bei der Probennahme wurde darauf geachtet, alle Makrostadien von der Entwicklung der Blütenstände bis hin zur Frucht- und Samenreife abzudecken. Die Makrostadien und die Mikrostadien, sowie der Zeitpunkt der Probennahmen an den beiden `Spätburgunder`- Klonen 18 Gm und 1–84 Gm am Standort Geisenheim sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Klone bzw. die Tafeltraube am Standort Siebeldingen wurden lediglich zum Zeitpunkt BBCH 65, also zur Vollblüte beprobt.

3.1.8.4 Auswahl des Pflanzenmaterials 2007 und 2008

Im Jahr 2007 und 2008 wurden zusätzlich zu den beiden `Spätburgunder`- Klonen 18 Gm und 1–84 Gm der Klon INRA 777 am Standort Geisenheim beprobt. Dieser Klon ist ein französischer `Spätburgunder`- Klon, der einen kleinen kompakten Fruchtstand mit sehr kurzen Beerenstielchen ausbildet. Außerdem wurden die beiden `Chardonnay`- Klone 54 Gm und 1–45 Gm, sowie der `Grauburgunder`- Klon 1–30 Gm beprobt. Der `Chardonnay`- Klon 54 Gm bildet kleine kompakte Fruchtstände aus, der `Chardonnay`- Klon 1–45 Gm große lockere Fruchtstände.



Abb. 10: Die zusätzlich beprobten Klone in der Vegetationsperiode 2007 und 2008 von links nach rechts: der kompakte `Spätburgunder´– Klon INRA 777, der lockerbeerige `Chardonnay´– Klon 1–45 Gm, der lockere `Spätburgunder´– Klon M242, der lockerbeerige `Grauburgunder´– Klon 1–30 Gm und der kompakte `Chardonnay´– Klon 54 Gm. (Fotos: E. Schönhals, R. Antes)

Der `Grauburgunder´– Klon 1–30 Gm bildet ebenfalls lockere Fruchtstände aus. Am Standort Heppenheim wurden neben den oben beschriebenen `Spätburgunder´– Klonen 18 Gm, 1–84 Gm und INRA 777 noch aus dem Weinsberger Klon M242 Proben genommen. Dieser Klon zeichnet sich durch ein sehr lockeres Traubengerüst aus (Siehe Abbildung 10).

3.1.8.5 Phänotypische Beobachtung 2007 und 2008

Wie im Jahr 2006 wurde an den vier selben Einzelstöcken beider `Spätburgunder´– Klone 18 Gm und 1–84 Gm die phänologische Entwicklung von Elske Schönhals in Geisenheim dokumentiert. Zusätzlich wurde die phänologische Entwicklung der beiden `Chardonnay´– Klone dokumentiert.

3.1.8.6 Probennahme 2007 und 2008

Wie im Jahr 2006 wurde die BBCH – Skala verwendet, um die Zeitpunkte der Probennahme eindeutig zu definieren. In den Jahren 2007 und 2008 wurden zu den drei Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 73 Proben entnommen.

3.1.9 Pflanzenmaterial für Arbeiten mit genomischer DNA

Im Jahr 2008 wurden von den verschiedenen Klonen, an denen die Genexpressionsanalysen durchgeführt worden waren, neben den Gescheins–

bzw. Fruchtstands – Proben ebenfalls Blätter für Arbeiten mit genomischer DNA an den verschiedenen Standorten entnommen.

Des Weiteren wurde ein Probensatz verschiedener Sorten zusammengestellt, der drei unterschiedliche Arten der Traubenarchitektur präsentiert. Ein Teil der beprobten Sorten bildet einen kompakten Fruchtstand aus, der zweite Teil bildet einen lockeren Fruchtstand aus und der dritte Teil einen Fruchtstand, der sich als intermediär bezeichnen lässt, d.h. die Struktur des Fruchtstandes ist weder deutlich kompakt noch locker (Tabelle 8). Die Bonitur erfolgte nach OIV Deskriptor OIV 204, der das Merkmal “Dichte des Fruchtstandes“ beschreibt. Die Boniturnoten gehen von 1 bis 9; 1 beschreibt eine sehr lockeren Fruchtstand, 9 einen sehr kompakten Fruchtstand.

Tab. 8: Die Sorten des Probensatzes für unterschiedliche Ausprägung der Traubenstruktur. Die in rot geschriebenen Sortennamen stehen für rote Sorten, rosa steht für Róse und grün für weiße Sorten (<http://www.vivc.bafz.de>).

SORTE	ABSTAMMUNG	BONITUR
`Harslevelue´		<3
`Arbane´		<3
`Koshu´		<3
`Räuschling´		<3
`Black Rose´	(`Damas Rose´ x `Black Monukka´) x `Alphonse Lavallee´	<3
`Cardinal´	`Ahmeur Bou Ahmeur´ x `Alphonse Lavallee´	<3
`Regent´	`Diana´ (`Silvaner´ x `Müller-Thurgau´) x `Chambourcin´	5
`Dornfelder´	`Helfensteiner´ x `Heroldrebe´	5
`Kerner´	`Trollinger´ x `Riesling´	5
`Müller-Thurgau´	`Riesling´ x `Madeleine Royale´	6
`Muskateller´		6
`Riesling´	`Heunisch´ x <i>V. sylvestris</i> oder (<i>V. sylvestris</i> x `Traminer´)	6
`Dunkelfelder´	`Portugieser´ x `Färbertraube´	6
`Traminer rot´		6
`Silvaner´	`Heunisch´ x (<i>V. sylvestris</i> x `Traminer´)	6
`Felicia´	`Sirius´ x `Vidal Blanc´	6
`Grauburgunder´	`Pinot´ Mutation	7
`Portugieser´		7
`Schwarzriesling´	`Pinot´ Mutation	7
`Dakapo´	`Deckrot´ (`Grauburgunder´ x `Teinturier´) x `Portugieser´	7
`St. Laurent´		7
`Villaris´	`Sirius´ x unbekannt	7

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit RNA aus Pflanzenmaterial

Generell gilt für Arbeiten mit RNA oder für Arbeiten zur Isolierung der RNA, dass sämtliches Arbeitsmaterial absolut RNase – frei sein muss. Prinzipiell könnten alle Arbeitsgeräte, Lösungen und sonstiges Arbeitsmaterial mit RNasen verunreinigt sein. Diese RNasen zeichnen sich durch eine große Stabilität aus, d. h. sie können mehrstündiges Autoklavieren bei 121 °C überstehen, und benötigen keine Cofaktoren zur Aktivierung. Aus diesem Grund ist es wichtig, sämtliches Arbeitsmaterial von den RNasen zu befreien, um die RNA vor Abbau durch die RNasen zu schützen.

3.2.1.1 Allgemeine Arbeitsschritte

Um mögliche RNasen zu zerstören, wurden alle Glaswaren, Mörser, Spatel und sonstigen Utensilien, die hitzestabil sind, im Ofen bei 250 °C für 5 Stunden erhitzt. Alle Puffer und Lösungen wurden mit RNase – freiem Wasser angesetzt. Hierzu wurde bidest. Wasser mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) in einer Endkonzentration von 0,1% versetzt, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, und anschließend bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Plastikware wurde aus neuen, steril verpackten Packungen entnommen. Alle Chemikalien, die für die RNA Extraktion und für die weiteren Arbeitsschritte benötigt wurden, waren neu gekauft und wurden ausschließlich für RNA Arbeiten verwendet.

Alle hitzelablen Geräte, Flächen, Elektrophorese – Kammern mit Zubehör wurden mit RNaseZAP[®] chemisch von möglichen RNasen befreit und anschließend mit DEPC behandeltem RNase – freiem Wasser gespült. Die wieder verwendbaren 30 ml Polypropylenbecher für die RNA Extraktion wurden zuerst gereinigt, in DEPC Wasser bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen und anschließend autoklaviert.

Während aller Arbeiten mit RNA wurden immer pulverfreie Latex – Handschuhe, die regelmäßig gewechselt wurden, getragen, um eine mögliche Verunreinigung mit RNasen durch die Hände zu verhindern.

Für Lösungen und Puffer, bei denen während der Herstellung der pH – Wert eingestellt werden musste, wurde die entsprechende Base bzw. Säure als Aliquot

aus frischen Flaschen entnommen. Der pH – Wert wurde nach entsprechender Zugabe mit einer zuvor gereinigten pH – Elektrode gemessen.

Die Reinigung der Elektrode erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Die pH – Elektrode zunächst mit 70 % Ethanol abreiben und dann für 30 sek im Ethanol belassen.
- Die Elektrode für 5 min in eine 1 N NaOH – Lösung tauchen.
- Anschließend gründlich mit DEPC – Wasser spülen.
- Mit Eichlösung pH 7,0 kalibrieren.
- Mit Eichlösung pH 9,0 kalibrieren.

3.2.1.2 Präparation der Gesamt – RNA aus der Weinrebe

Das Pflanzenmaterial für die RNA Extraktion wurde direkt beim Probennehmen im Feld mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial in vorgekühlten Mörsern unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerrieben. Die Isolierung der Gesamt – RNA erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Chang et al. (1993) und Zeng et al. (2002), welches jedoch für die Gescheinsproben leicht modifiziert werden musste:

- Je Probe 10 ml CTAB – Extraktionspuffer in ein 30 ml `Oak Ridge´ Gefäß geben und auf 65 °C im Wasserbad vorwärmen.
- Etwa 1 g gemörsertes und gefrorenes Pflanzenmaterial zum vorgewärmten Extraktionspuffer geben, auf dem Vortexer gründlich mischen und 10 min bei 65 °C im Wasserbad inkubieren.
- Proben 5 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen, gleiches Volumen an Chloroform – Isoamylalkohol (24 : 1) hinzugeben und 5 min durch schwenken mischen.
- Um die Phasen zu trennen, Probe in der Sigma Zentrifuge 2K15 im Rotor 12139 bei 10000 upm (8.500 x g) und 4 °C für 10 min zentrifugieren.
- Die obere Phase in ein neues, vorgekühltes 30 ml `Oak Ridge´ Gefäß überführen, nochmals mit gleichen Volumen Chloroform – Isoamylalkohol (24 : 1) (4 °C) mischen und mit 8.500 x g bei 4 °C für 10 min zentrifugieren.

- Die obere Phase in ein neues, vorgekühltes 30 ml `Oak Ridge´ Gefäß überführen und mit 15300 upm (20.000 x g) bei 4 °C für 30 min zentrifugieren.
- Die obere Phase in ein neues, vorgekühltes 30 ml Oak Ridge Gefäß überführen, ein Viertel des Volumens an 10 M LiCl hinzugeben.
- RNA über Nacht bei 4 °C fällen.
- RNA mit 20.000 x g bei 4 °C für 30 min abzentrifugieren.
- Den Überstand verwerfen.
- 5 ml EtOH (96%) hinzugeben und mit 20.000 x g bei 4 °C für 10 min zentrifugieren.
- Den Überstand verwerfen
- Abschließend das RNA – Pellet in 50 – 100 µl DEPC behandelten Wasser lösen.
- Ein Aliquot (2 µl) auf ein denaturierendes Agarosegel (siehe unter Punkt 3.2.3.3 RNA – Agarose – Gelelektrophorese) zur Kontrolle auftragen (die ribosomale RNA muss deutliche Banden ergeben).
- Ein Aliquot (2 µl) im Spektralphotometer messen, um die Konzentration der RNA zu bestimmen (siehe unter Punkt 3.2.3.1 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung).
- Die Proben wurden direkt weiterverarbeitet oder bei – 70 °C eingelagert.

CTAB – Extraktionspuffer:

- 2 % CTAB
- 2 % PVP K30
- 100 mM Tris – HCL, pH 8,0
- 25 mM EDTA
- 2 M NaCl 0,5 g/l Spermidin

mischen und autoklavieren
vor dem erwärmen Zugabe von
β – Mercaptoethanol (200 µl/ 10 ml)

3.2.1.3 DNase – Behandlung und anschließend Aufreinigung

Es ist nicht möglich, mit den heute verwendeten Protokollen zur RNA – Extraktion die verunreinigende genomische DNA vollständig zu eliminieren. Für alle Experimente zur Genexpression, wie die Microarray Analyse oder die Real Time

PCR ist es ein absolutes Muss, dass die zu untersuchenden RNA – Proben frei von genomischer DNA sein müssen, um falsche Ergebnisse zu vermeiden. Aus diesem Grund ist es notwendig, die isolierte RNA einer Behandlung mit RNase – freier DNase zu unterziehen. Diese Behandlung erfolgte mit dem “RNase-Free DNase Kit“ der Firma Qiagen. Der Vorteil dieser Behandlung ist, dass direkt im Anschluss ein Reinigungsschritt angeschlossen werden kann, um die RNA von möglichen Verschmutzungen reinigen zu können. Für diesen Reinigungsschritt wurde das “RNeasy MinElute Cleanup Kit“ von Qiagen verwendet. Beide Schritte, DNase – Behandlung und anschließende Aufreinigung wurden nach den jeweiligen Protokollen durchgeführt, wobei kleine Modifikationen erforderlich waren.

DNase – Behandlung:

- $\leq 87,5 \mu\text{l}$ RNA – Lösung mit max. 45 μg RNA in ein Eppendorf – Gefäß geben (45 μg ist die max. Kapazität der Silica Membran der Aufreinigungssäulchen).
- 10 μl RDD Puffer hinzugeben.
- 2,5 μl DNase I Stock Lösung hinzugeben.
- auf 100 μl mit DEPC behandeltem Wasser auffüllen.
- für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Anschließend direkt mit “RNeasy MinElute Cleanup Kit“ aufreinigen.

Aufreinigung:

- 100 μl RNA – Lösung (max. 45 μg) mit 350 μl RLT Puffer versetzen und mit Pipette gut mischen.
- 250 μl EtOH (96 %) hinzugeben und wiederum mit Pipette gut mischen.
- Die Probe (700 μl) in eine RNeasy Mini Säule (rosa) überführen, anschließend in der Sigma Zentrifuge 2K15 im Rotor 12145 bei 10000 upm für 15 sek zentrifugieren.
- Durchlauf und Eppendorf – Gefäß verwerfen.
- RNeasy Mini Säule in ein neues Eppendorf – Gefäß überführen und 500 μl des RPE Puffers in das RNeasy Mini Säule geben.
- 15 sek bei 10000 upm zentrifugieren und Durchlauf verwerfen.

- 500 µl EtOH (80 %) in die RNeasy Mini Säule geben und im Rotor 12145 bei 10000 upm (8.000 x g) für 2 min zentrifugieren.
- Durchlauf und Eppendorf – Gefäß verwerfen.
- RNeasy Mini Säule in ein neues Eppendorf – Gefäß überführen und 5 min bei 15300 upm (18.500 g) zentrifugieren.
- RNeasy Mini Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf – Gefäß überführen und 25 – 35 µl DEPC – Wasser direkt auf die Membran geben.
- 1 min bei 8.000 x g zentrifugieren.
- Ein Aliquot (2 µl) auf ein denaturierendes Agarosegel zur Kontrolle auftragen.
- Ein Aliquot (2 µl) im Spektralphotometer messen, um die Konzentration der RNA zu bestimmen.
- Die Proben wurden direkt weiterverarbeitet oder bei – 70 °C eingelagert.

3.2.1.4 Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in cDNA wurde entsprechend der Angaben des Herstellers mit dem “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems) in einem Schritt durchgeführt. Für die Umschreibung wurde in einem 100 µl Reaktionsansatz jeweils 1 µg isolierte Gesamt – RNA, 10 µl Random Hexamer Primer, 4 µl dNTPs (je 0,2 mM), 10 µl RT Puffer (10x) sowie 5 µl MultiScribe™ RT – Polymerase (50 u/µl) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde abhängig von der Konzentration der isolierten Gesamt – RNA mit DEPC – Wasser entsprechend aufgefüllt. Nach einer Initialisierungsphase von 10 min bei 25 °C erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA anschließend bei 37 °C für 120 min und die Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 85 °C für 5 sek. Als Kontrolle wurde ein identischer Reaktionsansatz ohne MultiScribe™ RT – Polymerase angesetzt, um die Abwesenheit möglicher Kontaminierung mit genomischer DNA zu kontrollieren.

3.2.2 DNA Extraktion aus der Weinrebe

Das Pflanzenmaterial für die DNA Extraktion wurde direkt beim Probennehmen im Feld mit flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial in vorgekühlten Mörsern unter Zugabe von flüssigem Stickstoff

zu feinem Pulver zerrieben. Die Isolierung der Gesamt – DNA erfolgte nach dem Protokoll des “DNeasy® Plant Mini Kit“:

- Zu max. 100 mg Probe 400 µl AP1 Puffer und 4 µl RNase Stammlösung (100 mg/ml) geben, auf dem Vortexer gründlich mischen und 10 min bei 65 °C im Wasserbad inkubieren.
- 130 µl AP2 Puffer zur Probe geben und für 10 min auf Eis inkubieren.
- In Sigma Zentrifuge 2K15 im Rotor 12145 bei 15300 upm (18.500 x g) für 10 min zentrifugieren.
- Die obere Phase in die QIAshredder Mini Spin Säule (lila) überführen und für 2 min bei 18.500 x g zentrifugieren.
- Den Durchfluss in ein neues Eppendorf – Gefäß überführen; 1,5 faches Volumen (ca. 675 µl) AP3 Puffer zugeben und mit der Pipette gut mischen.
- 650 µl der Probe in eine DNeasy Mini Spin Säule geben und für 1 min bei 8.000 x g zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
- Den Rest der Probe auf die DNeasy Mini Spin Säule geben und für 1 min bei 8.000 x g zentrifugieren. Durchlauf und Eppendorf – Gefäß verwerfen.
- DNeasy Mini Spin Säule in ein neues Eppendorf – Gefäß überführen, 500 µl EtOH (80 %) hinzugeben und für 1 min bei 18.500 x g zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
- 500 µl EtOH (80 %) hinzugeben und für 2 min bei 18.500 x g zentrifugieren. Durchlauf und Eppendorf – Gefäß verwerfen.
- 100 µl H₂O direkt auf die Membran geben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren. 1 min bei 18.500 x g zentrifugieren.
- Erneut 100 µl H₂O direkt auf die Membran geben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren. Abschließend 1 min bei 18.500 x g zentrifugieren.
- Ein Aliquot (2 µl) auf ein Agarosegel zur Kontrolle auftragen.
- Ein Aliquot (2 µl) im Spektralphotometer messen, um die Konzentration der DNA zu bestimmen.
- Die Proben wurden direkt weiterverarbeitet oder bei – 20 °C gelagert.

3.2.3 Gelelektrophorese

3.2.3.1 Agarose – Gelelektrophorese

Die Agarose – Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse von Nukleinsäure – Fragmenten (DNA oder RNA), die entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und mit Fragmenten bekannter Größe (Längenmarker) (vergl. Kapitel 3.1.7) verglichen werden können. Sie funktioniert wie ein molekulares Sieb, in der ein elektrisches Feld negativ geladene DNA – oder RNA – Fragmente zur positiv geladenen Elektrode (Anode) transportiert und in Abhängigkeit von ihrer Größe auftrennt. Das Laufverhalten ist von unterschiedlichen Faktoren wie z.B. der elektrischen Feldstärke, der Porengröße des Gels, der Ionenstärke des Puffers, dem pH – Wert, der Temperatur und der Nettoladung des Moleküls abhängig. Zur Auftrennung von Nukleinsäuren wurden in dieser Arbeit 1 – 2 %ige Agarosegele unter Verwendung von Tris – Acetat – EDTA Puffer (TAE), pH – Wert = 8,0 verwendet. Der Nachweis der DNA – und RNA – Proben erfolgte nach Betrachtung der mit Ethidiumbromid (0,05 %) gefärbten Gele unter UV – Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm in einer Gel – Dokumentationsanlage (Biostep, Jahnsdorf). Die Agarosegele wurden fotografiert und zur Weiterverarbeitung digital gespeichert.

3.2.3.2 DNA – Agarose – Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA – Proben erfolgte jeweils in 1 – 2 %igen Agarosegelen. Nach Vorbereitung wurden die DNA – Proben und ein Längenstandard (Marker) mit 1/5 Volumen Ladepuffer (5x) versetzt, in die Taschen des Agarosegels aufgetragen und in TAE – Puffer (1x), pH – Wert = 8,0 bei 90 V und 150 – 300 mA für 120 – 150 min. aufgetrennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung konnte hochmolekulare DNA (>21 kbp) nachgewiesen werden.

1x TAE – Puffer:	40 mM Tris – Acetat pH 7,9 2 mM EDTA mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen
5x Probenpuffer DNA:	700 µl 1x TAE – Puffer, pH 8,0 300 µl Glycerin 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 % (w/v) Xylencyanol

3.2.3.3 RNA – Agarose – Gelelektrophorese

Die Qualität der isolierten RNA wurde mit einem denaturierenden Formaldehyd – Agarosegel überprüft. Dabei wurde durch Zugabe von Formaldehyd die RNA denaturiert und die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert. Alle RNA Arbeiten wurden zum Schutz vor Kontamination durch RNasen unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle Puffer wurden mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA – Proben erfolgte jeweils in 1,5 %igen Formaldehyd – Agarosegelen. Die RNA – Proben sowie ein Längenstandard (RiboRuler High Range RNA Ladder, Fermentas) wurden mit 1/5 Volumen RNA-Ladepuffer (5x) versetzt, in die Taschen des Agarosegels pipettiert und in TAE – Puffer (1x), pH – Wert = 8,0 bei 70 V und 150 mA für 60 min aufgetrennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA konnten zwei spezifische Bandenmuster nachgewiesen werden, die für die beiden Untereinheiten der ribosomalen RNA (18S rRNA und 28S rRNA) von Eukaryonten charakteristisch sind und jederzeit in der Pflanze exprimiert sind.

5x Probenpuffer RNA: 4000 µl 10x TAE – Puffer
 3084 µl Formamid
 2 µl 100 % Glycerol
 720 µl 37 % Formaldehyd
 16 µl gesättigte Bromphenolblau Lösung
 80 µl 500 mM EDTA (pH 8,0) auf 10 ml mit DEPC – Wasser

3.2.4 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

3.2.4.1 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) wurde spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion bei den Wellenlänge von 230 nm, 260 nm und 280 nm im Photometer durchgeführt. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Konzentration von 50 µg bei doppelsträngiger DNA pro Milliliter und 40 µg/ml bei RNA.

Der Quotient A_{230}/A_{260} gibt Auskunft über die Verunreinigung mit phenolischen Verbindungen, der Quotient A_{260}/A_{280} über die Verunreinigung mit Proteinen. Der Quotient A_{230}/A_{260} sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen, der Quotient A_{260}/A_{280} bei DNA zwischen 1,7 und 1,9 bei RNA zwischen 1,9 und 2,1. Abweichende Werte weisen auf Verunreinigungen hin, die eine genaue Messung der Konzentration der betreffenden Nukleinsäure unmöglich macht. In diesen Fällen ist eine zusätzliche visuelle Überprüfung der Konzentration durch Auftrennung in einem Agarosegel sinnvoll. Die photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren wurde mit dem NanoPhotometerTM von Implen (München) durchgeführt.

3.2.4.2 Elektrophoretische Konzentrationsbestimmung

Hierzu wurden definierte Konzentrationen an Lambda – DNA (120 ng/ μ l, 80 ng/ μ l und 40 ng/ μ l) als Standard neben den zu untersuchenden DNA – Proben auf einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,025 %ige Lösung) wurde die Bandenintensität verglichen und die jeweilige Konzentration der einzelnen DNA – Probe abgeschätzt.

3.2.5 Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)

Die Methode der PCR dient der enzymatischen in – vitro Amplifikation bestimmter Nukleinsäureabschnitte zum diagnostischen Nachweis und zur Analyse. Die erfolgt durch hitzestabile Enzyme (z.B. *Taq* – DNA – Polymerase), die in Anwesenheit von Nukleotiden (dNTPs) kurze Oligonukleotidsequenzen (Primer) mit einem freien 3' – OH Ende entsprechend verlängern und somit den gewünschten DNA – Abschnitt vervielfältigen können.

Eine typische PCR – Reaktion (Abb. 8) besteht in der Regel aus drei unterschiedlichen Schritten: *Denaturierung* (1), *Primeranlagerung* (2) und *Synthese* (3).

Nach Denaturierung des DNA – Doppelstrangs bei 94 °C in zwei Einzelstränge werden im darauf folgenden Schritt der Hybridisierung bei einer optimalen Temperatur (60 °C) die synthetisch hergestellten Primer komplementär an die Zielsequenz angelagert und durch die hitzestabile *Taq* – DNA – Polymerase bei 72 °C verlängert (Abb. 11 A). Dieser Reaktionsablauf erfolgt zyklisch 30 – 40 mal

hintereinander (Abb. 11 B), wobei das PCR – Produkt mit jedem weiteren PCR – Zyklus unter optimalen Bedingungen verdoppelt wird.

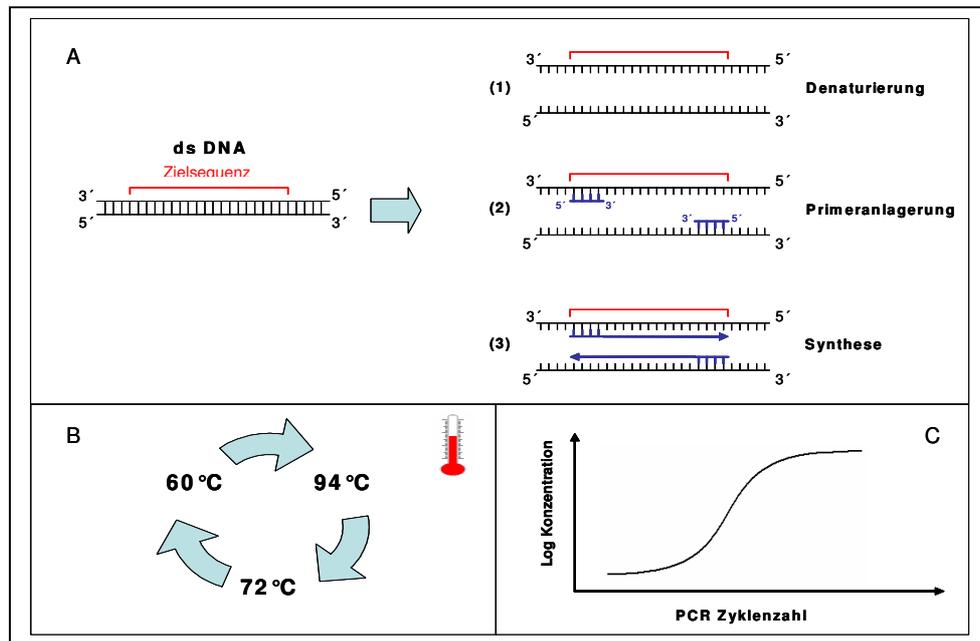


Abb. 11: Prinzip (A) und Verlauf der PCR – Reaktion (B,C)

Die Konzentration des PCR – Produktes wird dabei logarithmisch gegen die PCR Zyklenzahl (n) aufgetragen (Abb. 11 C).

3.2.5.1 Reverse Transkriptase – PCR

Zur Überprüfung der Amplifikatgröße der Kandidatengene und Referenzgene für die Real Time PCR wurde eine Reverse Transkription/ PCR durchgeführt. Der Unterschied zur Standard PCR ist der Einsatz von cDNA anstatt genomischer DNA. Zur Durchführung einer RT – PCR wurde in einem 25 µl Reaktionsansatz jeweils 5 ng cDNA, PCR – Puffer (1x), Primer For/Rev (0,4 µM), dNTP – Mix (je 0,2 mM), sowie *Taq* – DNA – Polymerase (0,1 U) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit ddH₂O bis auf ein Gesamtvolumen von 25 µl entsprechend aufgefüllt. Die PCR Bedingungen zur Durchführung einer RT – PCR waren wie folgt:

Standarddenaturierung	95 °C	10 min	1x
Denaturierung	95 °C	1 min	} 35x
Primeranlagerung	variabel	1 min	
Synthese	72 °C	1 min	
Finale Synthese	72 °C	5 min	1x

Anschließend wurden die PCR – Produkte in 1,5 %igen Agarosegelen in 1x TAE – Puffer, pH – Wert = 8,0 aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung unter UV – Licht fotografiert.

3.2.5.2 Gradienten – PCR

Zur Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur der Primer an die jeweilige Matrize wurde eine Gradienten – PCR durchgeführt. Die Temperatur ist von der Schmelztemperatur (T_m) der Primer abhängig, bei der mindestens 50 % der Primer an die Ziel – DNA gebunden vorliegen. Die Schmelztemperatur wurde mathematisch mit Hilfe der Gleichung: $T_m = 2 \text{ °C} \times (A+T) + 4 \text{ °C} \times (C+G)$ errechnet und diente als Ausgangswert für die weitere experimentelle Bestimmung des optimalen T_A – Wertes, der von der Länge und Sequenz der Primer abhängig ist. Die experimentelle Bestimmung des T_A – Wertes erfolgte durch einen Temperaturgradienten ($T_m 65 \pm 7 \text{ °C}$) in einem Gradientencycler (Eppendorf), wobei an verschiedenen Annealingtemperaturen identische PCR – Ansätze durchgeführt wurden. Die Menge der gebildeten PCR – Produkte, die sich aus der Intensität der Bande im Agarosegel ergibt, weist somit auf eine optimale Anlagerungstemperatur hin.

Zur Durchführung einer Gradienten – PCR wurde in einem 25 μ l Reaktionsansatz jeweils 50 ng DNA, PCR – Puffer (1x), Primer For/Rev (0,4 μ M), dNTP – Mix (je 0,2 mM), sowie *Taq* – DNA – Polymerase (0,1 U) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit dH₂O bis auf ein Gesamtvolumen von 25 μ l entsprechend aufgefüllt. Die PCR Bedingungen zur Durchführung einer Gradienten – PCR waren wie folgt:

Initiale Denaturierung	95 °C	10 min		1x
Denaturierung	95 °C	1 min	}	35x
Primeranlagerung	65 \pm 7 °C	1 min		
Synthese	72 °C	1 min		
Finale Synthese	72 °C	10 min		1x

Anschließend wurden die PCR – Produkte in 1,5 %igen Agarosegelen in 1x TAE – Puffer, pH – Wert = 8,0 aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung unter UV- Licht fotografiert.

3.2.5.3 Touchdown – PCR

Bei einer Touchdown – PCR (Don et al. 1991) wird die Anlagerungstemperatur im PCR Programm schrittweise reduziert. Diese Methode erhöht die Spezifität der PCR. Die Anlagerungstemperatur der Primer im ersten Zyklus sollte 5 – 10 °C über dem geschätzten T_A – Wert liegen. In den anschließenden Zyklen wird die Anlagerungstemperatur schrittweise um 1 – 2 °C pro Zyklus reduziert, bis eine Temperatur erreicht wird, die dem geschätzten T_A – Wert der Primer entspricht oder 2 – 5 °C darunter liegt. Die Touchdown – PCR erhöht die Spezifität der ersten Primer – Matrizen – Hybridisierung und somit die Spezifität der PCR Reaktion, bei niedriger Annealingtemperatur garantiert sie eine hohe Ausbeute. Der Unterschied zur normalen PCR liegt also ausschließlich am Temperaturzyklus. Die Bedingungen für eine Touchdown – PCR waren beispielhaft wie folgt:

Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1x
Denaturierung	95 °C	1 min	} 10x
Anlagerung	72 °C (-1,5°C/Zyklus)	1 min	
Synthese	72 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	} 25x
Synthese	60 °C	1 min	
Amplifikation	72 °C	1 min	
Schlusspolymerisation	72 °C	10 min	1x

Anschließend wurden die PCR – Produkte in 1,5%igen Agarosegelen in 1x TAE – Puffer, pH – Wert = 8,0 aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht fotografiert.

3.2.5.4 Kolonie – PCR

Die Kolonie – PCR wurde zur Detektion von *Insert* – Fragmenten in Vektoren nach der Klonierung und Transformation verwendet. Dabei wurde zur PCR direkt Zellmaterial von einer Kolonie rekombinanter Bakterien auf selektivem Nährmedium eingesetzt, um das gesuchte Fragment mit Hilfe geeigneter Primer zu amplifizieren. Zur Durchführung der PCR wurde wenig Zellmaterial von Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher direkt in das vorbereitete PCR –

Reaktionsgemisch suspendiert. Dieses bestand aus jeweils PCR – Puffer (1x), Primer T3/T7 (0,4 µM), dNTP – Mix (je 0,2 mM), sowie *Taq* – DNA – Polymerase (0,1 U). Der Reaktionsansatz wurde mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Die verwendeten Primer T3 und T7 sind Sequenzierungsprimer, die anschließend auch für die Plasmid Sequenzierung eingesetzt werden konnten. Die Bedingungen für eine Kolonie – PCR waren wie folgt:

Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1x
Denaturierung	95 °C	1 min	} 35x
Primeranlagerung	58 °C	1 min	
Synthese	72 °C	1 min	
Finale Synthese	72 °C	10 min	1x

Anschließend wurden die PCR – Produkte in 1,5 %igen Agarosegelen in 1x TAE – Puffer, pH – Wert = 8,0 aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht fotografiert.

3.2.6 Microarray Analyse

3.2.6.1 Experimentelles Design

Für die vergleichenden Genexpressionsanalysen wurde das Pflanzenmaterial des Jahres 2006 verwendet. Insgesamt wurden vier verschiedene Vergleiche zu drei verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt. Zu den zwei Entwicklungsstadien BBCH 57 und 73 wurde die Genexpression der beiden `Spätburgunder` – Klone 18 Gm und 1 – 84 Gm miteinander verglichen, zum Stadium BBCH 65, wurden die beiden `Spätburgunder` – Klone mit der lockerbeerigen Tafeltraube `Cardinal` verglichen. Im vierten Vergleich wurden die beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 73 miteinander verglichen.

3.2.6.2 Genexpressionsanalyse

Die Microarray Analysen wurden im Service vom RZPD in Berlin durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde Gesamt – RNA von allen Proben nach Berlin geschickt. Der Service beinhaltete folgende Schritte: Zunächst wurde poly (A)⁺ mRNA isoliert, welche im BioAnalyser auf ihre Qualität überprüft wurde. Anschließend wurde die mRNA in cDNA umgewandelt, dann unter Biotin – Markierung in vitro in

cRNA transkribiert und fragmentiert. Die Biotin markierten cDNA – Fragmente wurden auf den Affymetrix *Vitis vinifera* GeneChip® hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Biotin markierte cDNA mit Streptavidin – Phycoerythrin angefärbt. Streptavidin ist ein aus vier identischen Untereinheiten aufgebautes Protein, wobei jede mit sehr hoher Affinität ein Biotin – Molekül binden kann. Phycoerythrin ist ein bei Cyanobacteria (Blaualgen) und Rotalgen vorkommendes akzessorisches Pigment der Photosynthese von roter Farbe, welches ein Absorptionsmaximum zwischen 529 – 534 nm Wellenlänge zeigt. Anschließend wurde der Chip gewaschen, um ihn von überschüssigen Farbstoff und ungebundener cDNA zu reinigen. Durch Anregung mit einem Laser wurde die Fluoreszenzemission des Farbstoffes gemessen, und als Bild abgespeichert.

3.2.6.3 Bioinformatische Auswertung

Die bioinformatische Auswertung der Genexpressionsanalyse mittels Microarray Hybridisierungen wurde ebenfalls im Service vom RZPD in Berlin durchgeführt. Diese beinhaltet die Normalisierung, die das Ziel verfolgt, alle Arrays vergleichbar zu machen. Als grafisches Mittel für die Visualisierung zweier Arrays dient der M versus A (MvA) – Plot, eine Abwandlung des „Bland – and – Altman – Plots“ (Altman und Bland, 1983; Bland und Altman, 1986). Bei dieser grafischen Methode werden die Differenzen zweier Messreihen gegen den Mittelwert der beiden Messreihen abgetragen. Die Daten wurden in die zwei Gruppen „locker“ und „kompakt“ eingeteilt, die als Konditionen des Experimentes definiert wurden. Da pro Kondition zwei Hybridisierungen erfolgten, wurde der „fold change“ und der „log – fold change“ mittels dem t – Test berechnet. Als p – Wert, welcher die Wahrscheinlichkeit angibt, das die Null – Hypothese verworfen wird, obwohl sie richtig ist, wurde der Wert 0,05 festgelegt. Als Ergebnis wurden für jedes Experiment die Top 100 differentiell exprimierten Gene bestimmt. Diese konnten sowohl hoch – als auch herunterreguliert sein.

3.2.6.4 Einteilung nach molekularer Funktion

Um potentielle Kandidatengene für das Merkmal Lockerbeerigkeit zu identifizieren, mussten die differentiell exprimierten Gene zunächst nach ihrer molekularen Funktion gruppiert werden. Dies erfolgte mit Hilfe der GrapePLEX Datenbank.

3.2.7 Real Time PCR

3.2.7.1 Quantitative Real Time PCR

Zunächst wurden einige Versuche durchgeführt, um die optimale Methode einschließlich der Analyse für das Real Time Experiment zu definieren. Hierzu zählte die Wahl der Methode zur relativen Quantifizierung, um möglichst effizient arbeiten zu können. Als effizienteste Methode erwies sich die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode. Hier wird die unterschiedliche Expression als n – fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta\text{CT}$ Wertes angegeben. Wichtig bei diesem Verfahren ist eine gleiche Effizienz der beiden zu vergleichenden PCR – Reaktionen. Die CT – Werte werden hierbei einfach subtrahiert (ΔCT). Die beiden ΔCT Werte der einzelnen Gruppen (kompakt/locker) werden voneinander abgezogen ($\Delta\Delta\text{CT}$ Wert) und in die Gleichung n – fache Expression (Gruppe A zu Gruppe B) = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ eingesetzt. In Verbindung mit dem Programm „LinRegPCR“ (zur Bestimmung der PCR – Effizienz) (Ramakers et al. 2003) ist es möglich, die Expressionsraten der einzelnen Gene mit Hilfe des Programms „REST“ (Pfaffl et al. 2002) zu berechnen. Wichtig für die Analyse sind des weiteren die „Housekeeping Genes“ (HKG = Referenzgene), die möglichst in beiden Klonen zu allen Zeitpunkten stabil und im gleichen Maße exprimiert werden sollten. Diese dienen zur Normalisierung der Ergebnisse. Nachdem die Methode etabliert war, wurden mit Hilfe des Programms „geNorm“ (Vandesompele et al. 2002) eine Auswahl an Referenzgenen getroffen, die für das Real Time Experiment am stabilsten exprimiert wurden. Im nächsten Schritt erfolgte dann die Auswahl der Kandidatengene, die mit dem Experiment überprüft werden sollten.

3.2.7.2 Auswahl der Kandidatengene

Die Auswahl an Kandidatengenen für das Real Time Experiment wurde zum einen aus den Ergebnissen der Microarray Hybridisierung und zum anderen aus Genen, die nach Literaturangaben bekanntermaßen in anderen Pflanzen (z.B. Arabidopsis) Merkmale ähnlich der Lockerbeerigkeit beeinflussen, getroffen.

3.2.7.3 Entwicklung der Primerpaare zur Erstellung kurzer Amplifikate

Für alle Kandidatengene und für alle „Housekeeping Genes“ wurden zunächst Primer mit dem Programm „Primer Express“ von Applied Biosystems (*Darmstadt*)

entwickelt, die den optimalen Bedingungen der Real Time PCR entsprechen. Es wurde darauf geachtet, dass die zu erwartenden Amplifikate eine Größe von 70 - 120 bp aufweisen. Zur Überprüfung wurde eine RT – PCR durchgeführt (siehe Punkt 3.2.4.1)

3.2.7.4 Real Time PCR: Test der Kandidatengene

In einem quantitativen Real Time PCR Experiment wurden die Ergebnisse der Microarray Hybridisierung verifiziert und die Kandidatengene, die aus der Literatur abgeleitet worden waren, auf differentielle Expression zwischen den beiden 'Spätburgunder'-Klonen 18 Gm und 1–84 Gm getestet.

3.2.7.4.1 Experimentelles Design

Für die quantitative Real Time PCR wurde Pflanzenmaterial der beiden 'Spätburgunder'-Klone 18 Gm und 1–84 Gm aus den Entwicklungsstadien BBCH 57, 65 und 73 aus dem Jahr 2006 verwendet. An diesem Material wurden 35 Kandidatengene getestet. Für jede Reaktion wurden zwei biologische und eine technische Wiederholung durchgeführt. Zur Normalisierung wurden drei „Housekeeping Genes“ eingesetzt. Zur Kontrolle wurde für jedes Kandidatengene eine Kontrolle ohne Matrize eingesetzt.

3.2.7.4.2 Genexpressionsanalyse

Zur Durchführung einer qRT – PCR wurde in einem 25 µl Reaktionsansatz jeweils 5 ng cDNA, 8,33 µl *Power SYBR*[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) und Primer For/Rev (je 0,4 µM) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Die PCR Bedingungen zur Durchführung einer quantitativen Real Time PCR waren wie folgt:

Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1x
Denaturierung	95 °C	0:15 min	} 40x
Primeranlagerung/Synthese	58 °C	1 min	

Im Anschluss an die qRT – PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob spezifisch das gewünschte Fragment amplifiziert wurde.

3.2.7.4.3 Bioinformatische Auswertung

Die Auswertung der qRT – PCR erfolgte wie in Punkt 3.2.6.1 beschrieben. Die Rohdaten für Farbstoff Fluoreszenz (R_n) und CT – Werte wurden aus der „SDS Software“ (Applied Biosystems) exportiert. Mit den R_n – Werten lässt sich in „LinRegPCR“ die Amplifikationskurve jeder einzelnen Reaktion nachbilden, an der dann die PCR – Effizienz errechnet werden kann. Mit dieser und den CT - Werten kann mit „Rest“ die mögliche differentielle Expression zwischen zwei Proben bestimmt werden.

3.2.7.5 Real Time PCR: Kinetik 2006

In einem weiteren qRT – Experiment wurde für jedes der 35 Kandidatengene eine Kinetik des Expressionsmusters erstellt. Die qRT – PCR wurde bei sechs definierten Entwicklungsstadien durchgeführt, um mögliche Expressionsunterschiede und den Verlauf der Expression zwischen den beiden `Spätburgunder´– Klonen detektieren zu können. Dazu wurden die sechs Entwicklungsstadien BBCH 57, 61, 65, 69, 73 und 77 ausgewählt. Bezüglich der anderen Parameter erfolgte das Experiment analog der ersten qRT – PCR Experimente.

3.2.7.6 Real Time PCR: Kinetik 2007 und 2008

Im Jahr 2007 und 2008 wurden für neun Kandidatengene je eine Kinetik des Expressionsmusters für zehn ausgewählte Klone zu den drei Entwicklungsstadien BBCH 57, 65 und 73 erstellt.

3.2.8 Sequenzierung

3.2.8.1 Direktsequenzierung

Für alle interessanten Gene wurde zunächst *in silico* in den “Genome Projekt Results“ für *Vitis vinifera* (www.ncbi.nlm.nih.gov/) in den veröffentlichten Sequenzen des `Spätburgunder´– Klons PN40024 (Jaillon et al. 2007) der mutmaßliche Promotorbereich mit „VektorNTI“ (Invitrogen, Karlsruhe) gesucht. Für diese mutmaßlichen Promotorbereiche wurden je zwei flankierende Oligonukleotide entwickelt, mit denen ein ca. 1000 bp großes DNA – Fragment mittels Touchdown – PCR (siehe Kapitel 3.2.4.3) amplifiziert werden konnte.

Nach Überprüfung auf einem Agarosegel wurden die PCR – Produkte im Service direkt von GATC (*Konstanz*) sequenziert.

3.2.8.2 Klonierung und Transformation

Die Promotorbereiche der Kandidatengene, die in der Direktsequenzierung des PCR – Produkts keine klare Sequenz gezeigt hatten wurden kloniert. Hierfür wurde das Klonierungskit „TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing“ der Firma Invitrogen (*Karlsruhe*) verwendet. Die Klone, die positiv auf das gewünschte DNA – Fragment getestet werden konnten, wurden im Auftrag von GATC (*Koblentz*) sequenziert.

3.2.8.2.1 Klonierung in den Vektor pCR®4 – TOPO

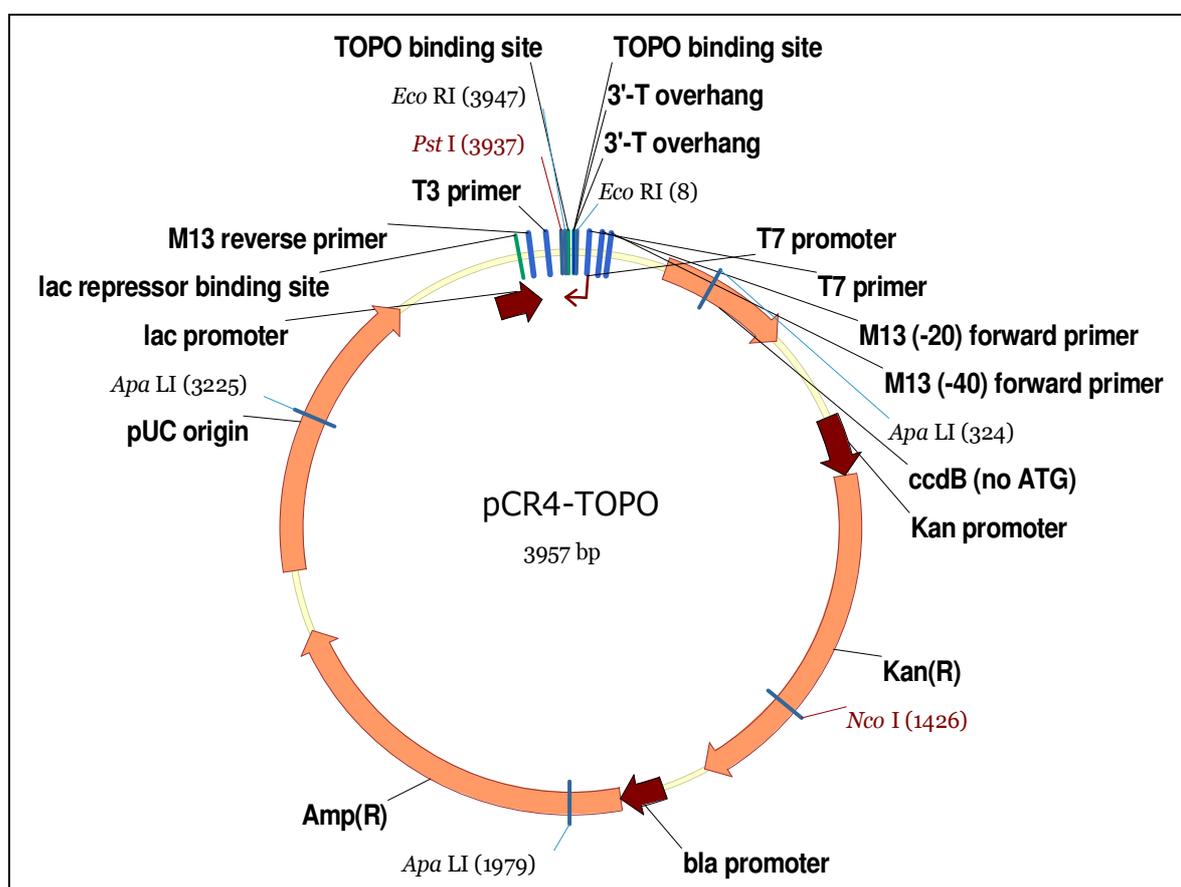


Abb. 12: Vektorkarte des Plasmids pCR®4Blunt – TOPO® . Für TA – Klonierung optimierter Vektor aus dem verwendeten “TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing“ von Invitrogen (*Karlsruhe*).

Mit dem “TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing“ ist es möglich, ein *Taq* – DNA – Polymerase amplifiziertes PCR – Produkt direkt in einen Plasmid Vektor zu klonieren. Die *Taq* – DNA – Polymerase hat eine Matrizen unabhängige terminale

Transferase Aktivität, die ein einzelnes Deoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR – Produkts anfügt. Der pCR®4 – TOPO Plasmid Vektor besitzt einen Einzel 3' - Thymin Überhang (Abbildung 12). Dieser Überhang erlaubt eine effiziente Verbindung des PCR – Produkts mit dem Plasmid Vektor. Der TOPO Vektor hat an die Vektor – DNA direkt eine Topoisomerase gekoppelt, welche die Ligation übernimmt.

Für die Klonierung wurden gemäß dem Protokoll des "TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing" 1 µl PCR – Produkt mit 0,5 µl pCR®4 – TOPO Plasmid Vektor vermischt, und für 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde der Klonierungsansatz in kompetente *E. coli* – Zellen des Stammes DH5α transformiert.

3.2.8.2.2 *E. coli* Transformation

E. coli – Zellen des Stammes DH5α wurden ca. 5 min auf Eis aufgetaut, mit 2 µg der zu transformierenden DNA versetzt und dann für weitere 10 min auf dem Eis belassen. Es folgten ein 30 sek langer Hitzeschock bei 42 °C und 5 min auf Eis. Nach Zugabe von 350 µl SOC – Medium wurde für 1 std bei 37 °C und 300 upm inkubiert. Je 100 µl und 150 µl wurden auf LB – Platten mit dem entsprechendem Antibiotikum Kanamycin (0,05 µg/l) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kontrolle auf erfolgreiche Insertion erfolgte durch Kolonie – PCR (siehe Kapitel 3.2.4.4). Von den positiven Klonen wurde eine Plasmidpräparation mit anschließender spezifischer Restriktionsanalyse durchgeführt. Die Plasmidpräparation erfolgte entweder mit dem „Plasmid Mini Kit“ von Qiagen (Hilden) oder nach dem Plasmidpräparations – Protokoll nach Holmes & Quigley (1981).

LB – Medium mit Agar:	10 g Trypton
	5 g Natriumchlorid
	15 g Agar
	5 g Hefeextrakt
	mischen und autoklavieren (121 °C für 20 min.)

Kanamycin – Arbeitslösung (50 µg/ml):	1 g Kanamycin
	Auf 20 ml mit ddH ₂ O auffüllen
	Sterilfiltrieren

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl der `Spätburgunder`– Klone für die Genexpressionsanalyse

Im Mittelpunkt der Genexpressionsanalysen standen die beiden `Spätburgunder`– Klone 18 Gm und 1–84 Gm. Wie bereits in den Kapiteln 3.1.8.2 und 3.1.8.5 erwähnt, wurden wöchentlich an vier ausgewählten Einzelstöcken der beiden Klone Fotos von Elske Schönhals in Geisenheim aufgenommen, um die phänotypische Entwicklung zu dokumentieren. Nachfolgend sind einige dieser Fotos aus dem Versuchsjahr 2006 beispielhaft dargestellt, welche die phänotypischen Unterschiede der beiden Klone verdeutlichen.

4.1.1 Klon 18 Gm

Der Klon 18 Gm ist ein kompakter, traditioneller `Spätburgunder`– Klon. Dieser Klon hat einen sehr dichten Traubenaufbau, so dass durch Abschnürungen und Quetschungen der Früchte untereinander die sogenannten „Botrytisnester“ innerhalb der Traube entstehen können.



Abbildung 13: Entwicklungsstadien bei dem `Spätburgunder` – Klon 18 Gm von links oben nach rechts unten: BBCH 53, BBCH 55, BBCH 57, BBCH 71, BBCH 73, BBCH 75, BBCH 79 und BBCH 85 (Fotos: E. Schönhals).

Andererseits wird diesem Klon, neben einigen anderen, das klassische Spätburgunderaroma zugesprochen. In Abbildung 13 ist die phänotypische Entwicklung anhand einiger Entwicklungsstadien einer Traube bei Klon 18 Gm in der Vegetationsperiode 2006 beispielhaft dargestellt. Auffällig bei Klon 18 Gm ist, dass schon die Anzahl der Blüten an den Blütenständen sehr groß war und sich daraus sehr kompakte Trauben mit sehr kurzen Beerensielchen entwickelten. Dies führt schon ab Entwicklungsstadium 79 schon zu ausgeprägten Quetschungen der einzelnen Beeren, wodurch die Gefahr eines Botrytisbefalls steigt.

4.1.2 Klon 1–84 Gm

Der Klon 1–84 Gm ist im Gegensatz zum Klon 18 Gm ein lockerbeeriger Typ mit einem lockereren Traubengerüstaufbau. Dies ist hauptsächlich auf die deutlich längeren Beerensielchen zurückzuführen.



Abbildung 14: Entwicklungsstadien bei dem 'Spätburgunder'-Klon 1–84 Gm von links oben nach rechts unten: BBCH 53, BBCH 55, BBCH 57, BBCH 71, BBCH 73, BBCH 75, BBCH 79 und BBCH 85 (Fotos: E. Schönhals).

Die Weinqualität oder die Aromausprägung, ist beim Klon 1–84 Gm vergleichbar dem Klon 18 Gm. Analog zu Abbildung 13 ist in Abbildung 14 die phänotypische Entwicklung einer Traube von Klon 1–84 Gm beispielhaft dargestellt. Im Vergleich zum Klon 18 Gm war die Blütenanzahl der Gescheine geringer, was sich durch stärkere Verrieselung des Klons 18 Gm wieder ausglich. Die Anzahl der Beeren pro Traube zur Ernte war bei beiden Klonen nahezu gleich. Auffällig ist die Länge der Beerenstielchen, welche beim Klon 1–84 Gm sehr viel länger sind als beim Klon 18 Gm.

4.1.3 `Cardinal`

Die Tafeltraubensorte `Cardinal` wurde als extrem lockerbeerige Referenzsorte ausgewählt. Die Genexpression zum Stadium BBCH 65 sollte mit der Genexpression der beiden `Spätburgunder`– Klone 18 Gm und 1–84 Gm verglichen werden. In Abbildung 15 ist die Tafeltraubensorte `Cardinal`, Standort Siebeldingen, im Entwicklungsstadium BBCH 85 abgebildet. Im Gegensatz zu den beiden `Spätburgunder`– Klonen trat bei `Cardinal` eine starke Verrieselung auf, wodurch die Trauben sehr locker wurden. Außerdem fällt auf, dass die Rachis der Fruchtstände bei `Cardinal` eindeutig länger ist, als bei den beiden `Spätburgunder`– Klonen, bei denen sich die Länge der Hauptachse nicht wesentlich unterscheidet. Festgehalten werden kann, dass das gesamte Traubengerüst, also auch die Beerenstielchen, von `Cardinal` um einiges länger und dadurch lockerer ist, als bei den beiden `Spätburgunder`– Klonen 18 Gm und 1–84 Gm.



Abbildung 15: Entwicklungsstadium BBCH 85 bei `Cardinal`

4.2 Etablierung der RNA – Extraktionsmethode

Qualitativ hochwertige RNA aus der Weinrebe zu extrahieren ist schwierig, da die Rebe sehr reich an Phenolen und Polysacchariden ist. Mit kommerziell erhältlichen Kits, beispielsweise von Qiagen (Hilden) oder Invitex (Berlin) lässt sich DNA mittlerweile gut aus Blättern von Weinreben extrahieren. Entsprechende Kits für die RNA – Extraktion dieser beiden und anderer Firmen führten jedoch bei der Weinrebe zu keiner qualitativ hochwertigen RNA. Hinzu kommt, dass sich das verwendete Pflanzenmaterial aus Gescheinen bzw. Traubengerüsten in relativ späten Entwicklungsstadien befand in denen die Weinrebe hohe Phenol- und Polysaccharidgehalte aufweist.

Aus diesem Grund wurde zunächst ein Protokoll von Chang et al. (1993) getestet, dass für die RNA Extraktion aus jungen Blättern von Pflanzen mit hohem Phenol- und Polysaccharidgehalt etabliert war. Die RNA – Fällung erfolgt hierbei durch Lithiumchlorid. In den Tests konnte mit dieser Methode erfolgreich RNA aus jungen Gescheinen (BBCH 53) extrahiert werden, für älteren Entwicklungsstadien war es jedoch nicht möglich, RNA zu extrahieren. Eine Modifikation des Protokolls von Chang ist bei Zeng et al. (2002) beschrieben. Durch zusätzliche Zentrifugationsschritte konnten damit Phenole und Polysaccharide bereits vor der LiCl – Fällung eliminiert werden. LiCl führt zu einer sehr spezifischen Fällung von RNA, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch ein geringer Teil an genomischer DNA mit präzipitiert wird. Daher empfahl es sich, an die Aufarbeitung nach dem Protokoll von Zeng et al. (2002) eine DNase Behandlung anzuschließen. Diese wurde mit der RNase – freien DNase von Qiagen durchgeführt. Der Vorteil hierbei ist, dass direkt im Anschluss der DNase – Behandlung ein weiterer Reinigungsschritt angeschlossen werden kann, um die RNA weiter reinigen zu können. Dafür wurde das Qiagen “MinElute Cleanup Kit“ verwendet. Damit lassen sich Verunreinigungen entfernen, die später Probleme bei der cDNA-Synthese, bei der Fluoreszenzmarkierung oder bei der Hybridisierung auf die Microarrays ergeben können.

Bei der Messung der so extrahierten RNA im Spektralphotometer ergaben sich $A_{230} : A_{260} : A_{280}$ Werte von 1 : 2 : 1, was auf eine gute Qualität der RNA schließen lässt. Die RNA, die nach der kombinierten Methode Zeng et al. (2002) (RNA Fällung mit LiCl) + DNase Abbau + Aufreinigung der Proben mit dem Qiagen Kit nach landolino et al. (2004) extrahiert worden war, stellte ein geeignetes Substrat

für die Reverse Transkriptase dar. Zur visuellen Überprüfung wurden die RNA – Proben auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 16).

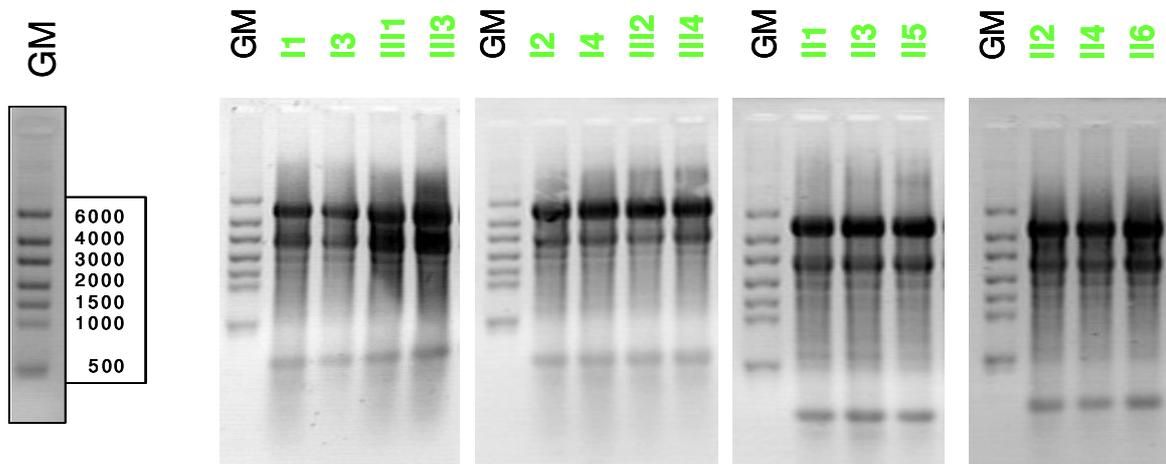


Abbildung 16: Gelelektrophoresebilder extrahierter RNA aus den Klonen 18 Gm, 1–84 Gm und aus `Cardinal` nach Zeng et al. (2002) mit zusätzlicher DNase Behandlung und anschließender Aufreinigung mit dem Qiagen „MinElute Cleanup Kit“; GM steht für den RNA – Größenmarker „RiboRuler High Range RNA Ladder“ (Fermentas, Leon-Rot); die römischen Zahlen stehen für den Probenahmezeitpunkt: I steht für BBCH 57, II für BBCH 65 und III für BBCH 73; 1 und 2 entsprechen dem Klon 18 Gm, 3 und 4 stehen für Klon 1–84 Gm, 5 und 6 enthalten RNA aus `Cardinal`

4.3 Microarray Analyse

4.3.1 Proben für die Genexpressionsanalyse

Für die Microarray Hybridisierungen wurde Pflanzenmaterial der beiden Geisenheimer `Spätburgunder`– Klone 18 Gm und 1–84 Gm aus den drei nach der BBCH Skala definierten Entwicklungsstadien BBCH 57 (Vollständige Entwicklung der Gescheine), BBCH 65 (Vollblüte) und BBCH 73 (Beeren sind Erbsengroß) verwendet. Die Tafeltraube `Cardinal` vom Standort Siebeldingen wurde lediglich zum Entwicklungsstadium BBCH 65 beprobt. Die extrahierte Gesamt – RNA wurde mit den relevanten Probandaten (siehe Tabelle 9) zum Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD, Berlin) geschickt, wo im Service die Microarray Hybridisierungen durchgeführt wurden. Die Minimalmenge, welche für eine erfolgreiche Array Hybridisierung benötigt werden, waren 3 µg RNA gelöst in 10 µl H₂O.

Tabelle 9: „Sample Submission Sheet“ für den Affymetrix Service. I - III stehen für die Probenahmezeitpunkte BBCH 57, 65 und 73. a und b geben die biologischen Wiederholungen an.

Nr.	ID	Klon	BBCH	Konzentration [ng/μl]	Volumen [μl]	OD 260/280
1	I1	18 Gm	57 a	970	10	2,1
2	I2	18 Gm	57 b	870	10	2,17
3	I3	1–84 Gm	57 a	1060	10	2,03
4	I4	1–84 Gm	57 b	1040	10	2,16
5	II1	18 Gm	65 a	1130	10	1,83
6	II2	18 Gm	65 b	1120	10	2,09
7	II3	1–84 Gm	65 a	1430	10	1,96
8	II4	1–84 Gm	65 b	690	10	2,15
9	II5	‘Cardinal’	65 a	1090	10	2,06
10	II6	‘Cardinal’	65 b	1170	10	2,16
11	III1	18 Gm	73 a	1080	10	1,94
12	III2	18 Gm	73 b	680	10	2,14
13	III3	1–84 Gm	73 a	1050	10	1,94
14	III4	1–84 Gm	73 b	1200	10	2,05

4.3.2 Experimentelles Design der Genexpressionsanalyse

Mit den in Tabelle 9 aufgeführten Proben wurden 14 Microarray Einzelhybridisierungen im Service vom RZPD durchgeführt. Mit diesen Einzelexperimenten wurden die vier folgenden Vergleiche durchgeführt:

1. Vergleich des Klons 18 Gm mit dem Klon 1–84 Gm zum Entwicklungsstadium BBCH 57 (Vollständige Entwicklung der Gescheine)
2. Vergleich der beiden Klone 18 Gm und 1–84 Gm mit der Tafeltraube ‘Cardinal’ zum Entwicklungsstadium BBCH 65 (Vollblüte)
3. Vergleich des Klons 18 Gm mit dem Klon 1–84 Gm zum Entwicklungsstadium BBCH 73 (Beeren sind Erbsengroß)
4. Vergleich der beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 73

Ziel der jeweiligen Vergleiche war die Identifizierung differentiell exprimierter Gene im jeweiligen Entwicklungsstadium. Um die Ergebnisse abzusichern, wurden in jedem Vergleich die Probe und die biologische Wiederholung jedes Vergleichspartners zusammen verrechnet. Anschließend wurden die jeweiligen Gruppen entsprechend der vier Vergleiche auf differentielle Expression hin analysiert.

4.3.3 Genexpressionsergebnisse

Jede der vier durchgeführten Genexpressionsanalysen mittels Microarray Hybridisierung führte zu einer großen Anzahl an unterschiedlich stark

hybridisierenden Genen. Um zu klären, ob jedes dieser Gene signifikant differentiell exprimiert war, wurde für das gesamte Experiment ein p – Wert festgelegt, der das Risiko angibt, bei dem die Null – Hypothese (H_0) verworfen wird, obwohl sie richtig ist. Die Null – Hypothese besagt in diesem Fall, dass es keine signifikanten Unterschiede in den Mittelwerten der Expressionswerte zwischen den vergleichenden experimentellen Bedingungen gibt. Für die durchgeführten Genexpressionsanalysen wurde der p – Wert auf 0,05 festgelegt. Alle Gene, die einen p – Wert von 0,05 oder größer hatten, wurden für die folgenden Untersuchungen nicht weiter betrachtet. Die zweite Bedingung für eine differentielle Expression ist der „fold change“ – Wert. Dieser gibt an, wie stark ein Gen im Vergleich zur Kontrolle in seiner Expression abweicht. Ein „fold change“ – Wert von 1 entspricht dabei einer gleich starken Expression in der Kontrolle und in der Probe. Werte größer 1 entsprechen einer Hochregulierung und Werte kleiner - 1 einer Herunterregulierung des Gens in der Probe. In Abbildung 17 sind summarisch alle Gene aus den vier Vergleichen dargestellt, deren p – Wert unter 0,05 liegt und deren „fold change“ – Wert <-1 oder >1 ist.

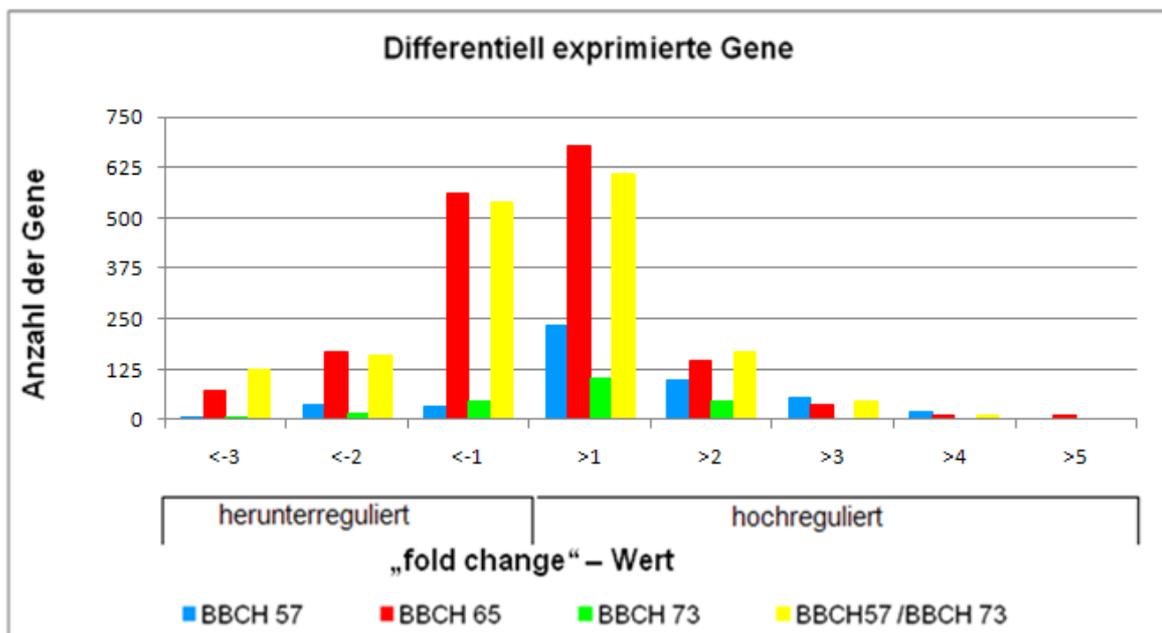


Abbildung 17: Darstellung aller 4052 Gene, die in den vier Vergleichen differentiell exprimiert waren. Alle Gene wurden nach ihrem „fold change“ in Expressionsklassen eingeteilt.

In den Vergleichen BBCH 57 und BBCH 73 wurden jeweils die Klone 18 Gm und 1–84 Gm auf differentiell exprimierte Gene hin untersucht. Der kompakte Klon 18 Gm diente in beiden Vergleichen als Kontrolle. Zum Entwicklungsstadium

BBCH 57 waren im Klon 1–84 Gm 406 Gene signifikant hochreguliert und 76 Gene signifikant herunterreguliert. Zum Entwicklungsstadium BBCH 73 zeigte Klon 1–84 Gm 154 signifikant hochregulierte und 71 signifikant herunterregulierte, Gene. Nach Einteilung in Regulationsklassen zeigte sich für beide Vergleiche, dass die differentiell exprimierten Gene einen relativ geringen „fold change“ aufwiesen.

Der Vergleich BBCH 65 sollte Unterschiede zwischen den beiden Klonen 18 Gm und 1–84 Gm und der Tafeltraube `Cardinal` aufzeigen. Die beiden `Spätburgunder`- Klone wurden in diesem Fall als Vergleichswerte definiert. Es konnten 886 signifikant hochregulierte Gene und 801 signifikant herunterregulierte Gene in `Cardinal` detektiert werden. Im Gegensatz zu den Vergleichen BBCH 57 und BBCH 73 waren eine sehr viel größere Anzahl an Genen differentiell exprimiert, und nach der Einteilung in Regulationsklassen wiesen diese einen durchschnittlich höheren „fold change“ – Wert auf. Der erhöhte Expressionsunterschied erklärt sich aus der größeren genetischen Distanz der Tafeltraube `Cardinal` zum `Spätburgunder`.

Im vierten Vergleich wurden die beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 73 verglichen. Hier wurde das Material des Entwicklungsstadiums BBCH 57 als Kontrolle definiert. Das Entwicklungsstadium BBCH 73 zeigte 835 signifikant hochregulierte und 823 herunterregulierte Gene. Nach der Einteilung in die Regulationsklassen wurde deutlich, dass die Anzahl an differentiell exprimierten Gene ähnlich der Zahl des Vergleichs BBCH 65 war, der „fold change“ – Wert aber eher, ähnlich dem der Vergleiche BBCH 57 und BBCH 73, relativ gering war.

4.3.4 Bestimmung der „Top 100“ Gene pro Vergleich

Die Gesamtanzahl von 4052 signifikant differentiell exprimierten Genen war für die weiteren Untersuchungen zu umfangreich. Aus diesem Grund wurden zunächst alle Gene, die nicht mindestens einen „fold change“ – Wert von $\pm 1,5$ aufwiesen von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Dadurch konnte die Gesamtanzahl auf 2138 reduziert werden (siehe Abbildung 18).

Im Vergleich BBCH 57 erschienen im Klon 1–84 Gm noch 262 Gene signifikant hochreguliert und 59 Gene signifikant herunterreguliert und im Vergleich BBCH 73 86 Gene signifikant hochreguliert und 37 Gene signifikant herunterreguliert. Im Vergleich BBCH 65 reduzierte sich die Anzahl signifikant hochregulierter Gene auf

398 und die Anzahl signifikant herunterregulierter Gene auf 415. Im Vergleich der beiden Entwicklungsstadien erschienen nun 427 Gene signifikant hochreguliert und 454 signifikant herunterreguliert.

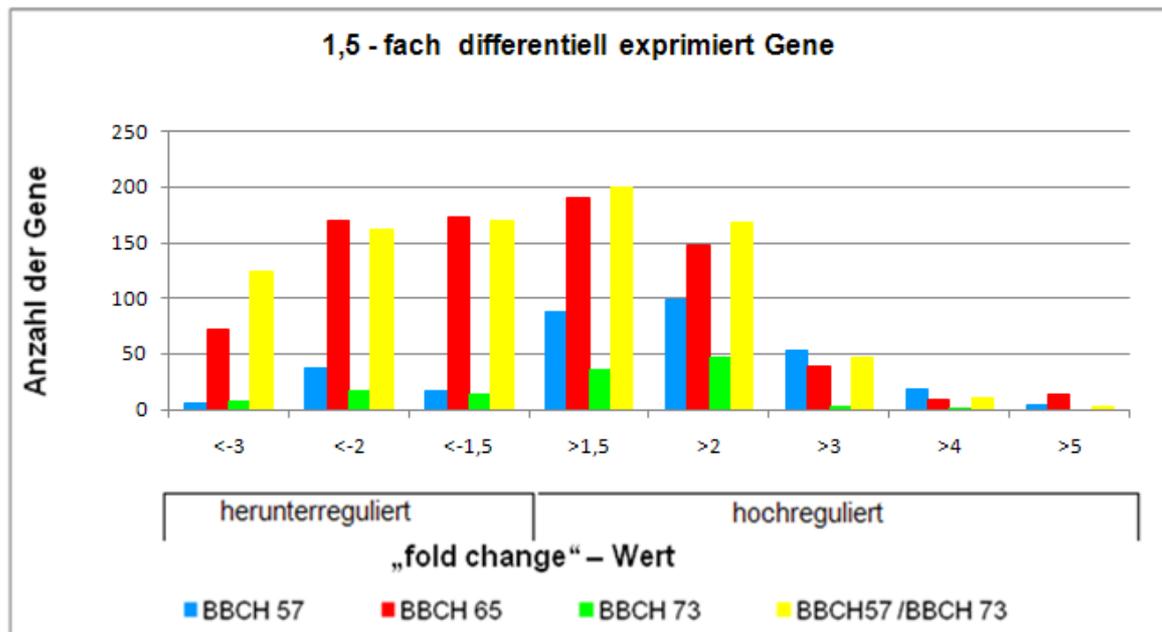


Abbildung 18: Darstellung der 2138 Gene, die in den vier Vergleichen mindestens einen „fold change“ – Wert von $\pm 1,5$ aufwiesen.

Für jeden Vergleich wurden anschließend die „Top 100“ differentiell exprimierten Gene bestimmt. Maßgeblich für die Auswahl war der „fold change“ – Wert. Es wurden die Gene ausgewählt, welche in den einzelnen Vergleichen die größten „fold change“ – Werte aufwiesen. Insgesamt konnten durch die Bestimmung der „Top 100“ Gene für die vier Vergleiche 379 verschiedene Gene detektiert werden.

4.3.5 Einteilung nach molekularer Funktion

Um potentielle Kandidatengene für das Merkmal Lockerbeerigkeit zu finden, wurde für die signifikant differentiell exprimierten Gene zunächst ihre molekulare Funktion aus der PLEX Datenbank herausgesucht und anschließend molekularen Funktionsgruppen zugeordnet. 202 Gene konnten den sechs folgenden molekularen Funktionsgruppen zugeordnet werden:

- Allgemeiner Stoffwechsel: 106 Gene
- Transkriptionsfaktoren: 6 Gene
- Transporter: 14 Gene

- Zell – Zyklus regulierende Gene: 16 Gene
- Umwelt – Informations – Signaltransduktion: 25 Gene
- Genetische – Informations – Signaltransduktion: 30 Gene

Die meisten Gene konnten dem allgemeinen Stoffwechsel zugeordnet werden. Es wurden Homologien zu Genen aus dem Energiestoffwechsel (34), dem Kohlenhydratstoffwechsel (25), der Biosynthese sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe (16), dem Aminosäurestoffwechsel (16), dem Fettsäuresynthesestoffwechsel (10) und dem Stoffwechsel von Vitaminen und Cofaktoren (5) gefunden.

182 Gene konnten keiner molekularen Funktionsgruppe zugeordnet werden, da keine Homologien mit den Dateneintragungen gefunden wurden. Ihre molekulare Funktion ist somit noch nicht bekannt.

Interessant für das Merkmal der Lockerbeerigkeit erschienen vor allem die Gene, die als Transkriptionsfaktor agieren, und die Gene, deren molekulare Funktion bisher unbekannt ist. Aus diesem Grund wurden die sechs Transkriptionsfaktoren und 14 Gene unbekannter Funktion ausgewählt (siehe 4.4.2), um sie mittels quantitativer Real Time PCR zu verifizieren.

4.4 Real Time PCR

4.4.1 Auswahl der „Housekeeping Genes“

Ein wichtiger Punkt für eine aussagekräftige Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real Time PCR (qRT PCR) ist die Auswahl geeigneter „Housekeeping Genes“ (HKG = Referenzgene). Diese spielen in der Auswertung als Bezugsgröße eine wichtige Rolle und sollten aus diesem Grund möglichst keinen Schwankungen in der Expression zwischen den beiden `Spätburgunder`-Klonen 18 Gm und 1–84 Gm unterliegen. Es wurde mit neun ausgewählten HKGs (Tabelle 10) eine qRT PCR durchgeführt. Die PCR – Effizienz wurde mit „LinRegPCR“ (Ramakers et al. 2003) für jedes HKG bestimmt. Außer bei den drei HKGs Actin (69,4 %), 18S (80,3 %) und MDH (87,7 %) lag die PCR – Effizienz immer über 90%.

Mit „geNORM“ wurden die HKGs für SAND, UBC und α – Tubulin als die drei stabilsten HKGs für die beiden `Spätburgunder` – Klone 1–84 Gm und 18 Gm ermittelt und für die weiteren qRT PCR Experimente zur Normalisierung verwendet.

4.4.2 Auswahl der Kandidatengene für Lockerbeerigkeit

Die Auswahl der Kandidatengene für die qRT PCR Experimente basiert zum einen auf den Ergebnissen der Microarray Hybridisierungen zum anderen auf Genen aus der Literatur, welche in anderen Pflanzen (z.B. *Arabidopsis*) Merkmale ähnlich der Lockerbeerigkeit beeinflussen.

Aus den Ergebnissen der Microarray Hybridisierungen wurden aufgrund der Höhe des Expressionsunterschiedes zwischen den beiden Klonen 18 Gm und 1–84 Gm insgesamt 20 Kandidatengene ausgewählt. Diese sind in Tabelle 11 näher beschrieben. Violett sind Gene unterlegt, die als Transkriptionsfaktoren agieren und rot solche, deren molekulare Funktion unbekannt ist.

Tab. 11: Ausgewählte Kandidatengene aus den Ergebnissen der Microarray Hybridisierung

Chip - ID	Unigene	Homologie	p - Wert	fold change	E -Wert
1621585_at	CK138212	shoot-forming PKSF1 [Paulownia kawakamii]	0,00574	1,53	4,00E-31
1607465_at	CD797253	WRKY-type DNA binding protein 1 [Vitis vinifera]	0,00677	1,82	4,00E-18
1621456_at	CF403507	RING-H2 finger protein RHG1a-like [Oryza sativa]	0,00008	-1,70	5,00E-26
1606561_at	CF373333	basic helix-loop-helix DNA binding protein TCP2 [Arabidopsis thaliana]	0,00225	-1,64	5,00E-14
1616571_at	CF205416	zinc ion binding [Arabidopsis thaliana]	0,00544	1,55	4,00E-21
1613707_at	CB912108	bZIP transcription factor bZIP126 [Glycine max]	0,00962	3,00	3,00E-07
1616226_at	CB002795	Transcribed locus	0,00302	-3,08	
1613995_at	CB341658	Transcribed locus	0,00029	-3,02	
1621724_at	CB341760	Transcribed locus	0,00143	3,54	
1621188_at	CD009416	Transcribed locus	0,00048	4,19	
1618722_at	CD721663	unnamed protein product; hypothetical start [Medicago truncatula]	0,00233	-2,16	3,00E-15
1622809_at	CF202148	Transcribed locus	0,00381	3,36	
1608771_x_at	CF203567	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	0,00296	3,53	1,00E-42
1612357_s_at	CF203581	Transcribed locus	0,00023	3,57	
1622809_at	CF204825	unknown	0,00381	3,36	
1619740_at	CF214472	Unknown protein [Arabidopsis thaliana]	0,00073	3,31	2,00E-64
1617705_at	CF512412	Transcribed locus	0,00048	-3,62	
1620029_at	CF512494	Transcribed locus	0,00342	3,41	
1620893_at	CF512751	Transcribed locus	0,00018	3,37	
1614687_at	CF513596	Transcribed locus	0,00059	3,35	

Aus der Literatur wurden Kandidatengene ausgewählt, die in *Arabidopsis*, Tomate oder Mais beschrieben wurden. Ihre Orthologen in der Weinrebe könnten die Lockerbeerigkeit beeinflussen. Die ausgewählten Kandidatengene wurden mit den 57662 verfügbaren „Contigs“ der französisch – italienischen 8x *Vitis* Genomsequenz verglichen (Jaillon et al. 2007), um mögliche Homologien zu finden. Der große Vorteil hierbei besteht darin, dass es sich bei der sequenzierten Rebsorte um den weitgehend homozygoten `Spätburgunder´– Klon PN40024 handelt. Konnten Homologien in der *Vitis* Sequenz festgestellt werden, so wurden auf der Basis der gefundenen Genomsequenz Oligonukleotide für die qRT PCR entwickelt. Insgesamt konnten 14 Orthologe als interessante Kandidatengene in der Literatur identifiziert werden (Tabelle 12). Gelb unterlegt sind Genorthologe aus der Tomate, grün solche aus *Arabidopsis*.

Tab. 12: Ausgewählte Kandidatengene aus der Literatur

Abk.	Genname	TAIR / Unigene	Spezies	Annotierung
BLIND	Blind	AF426174	Tomate	MYB Transkriptionsfaktor
LAS	LATERAL SUPPRESSOR	AF098674	Tomate	GRAS Transkriptionsfaktor
CLV1	CLAVATA 1	AT1G75820	<i>Arabidopsis</i>	ATP bindendes Protein
CLV2	CLAVATA 2	AT1G65380	<i>Arabidopsis</i>	Rezeptor Protein Kinase
ER	ERECTA	AT2G26330	<i>Arabidopsis</i>	Rezeptor Protein Kinase
KNAT1	BREVIPEDICELLUS	AT4G08150	<i>Arabidopsis</i>	Homeobox Protein knotted 1
PYN	PENNYWISE	AT5G02030	<i>Arabidopsis</i>	DNA binding/ proteinbinding
MAX1	MORE AXILLARY GROWTH 1	AT2G26170	<i>Arabidopsis</i>	Cytochrome P450
MAX2	MORE AXILLARY GROWTH 2	AT2G42620	<i>Arabidopsis</i>	F - Box Protein
MAX3	MORE AXILLARY GROWTH 3	AT2G44990	<i>Arabidopsis</i>	Carotenoid cleavage dioxygenase 7
REV	REVOLUTA	AT5G60690	<i>Arabidopsis</i>	Homeodomain -Leucin Zipper Protein
STM	SHOOT MERISTEMLESS	AT1G62360	<i>Arabidopsis</i>	knotted-like homeodomain Protein
SPS	SUPERSHOOT	AT1G16410	<i>Arabidopsis</i>	Cytochrome P450
SUP	SUPERMAN	AT3G23130	<i>Arabidopsis</i>	Rezeptor Protein Kinase

4.4.3 Quantitative Real Time PCR Experiment – Test der Kandidatengene

Für insgesamt 34 Kandidatengenen wurden qRT PCR Experimente durchgeführt, um Expressionsunterschiede zwischen den beiden `Spätburgunder´– Klonen zu detektieren. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurden die drei HKGs für SAND, UBC und α – Tubulin verwendet. Zunächst wurden die Kandidatengene am Pflanzenmaterial der beiden `Spätburgunder´– Klone in den Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 73 auf differentielle Genexpression getestet. Ziel dieses

Experiments war es, die Ergebnisse der Kandidatengene der Microarray Analyse zu verifizieren und mögliche differentielle Genexpression der Kandidatengene aus der Literatur zwischen den `Spätburgunder`- Klonen detektieren zu können. Für jede Probe wurden drei biologische Wiederholungen und zwei technische Wiederholungen durchgeführt.

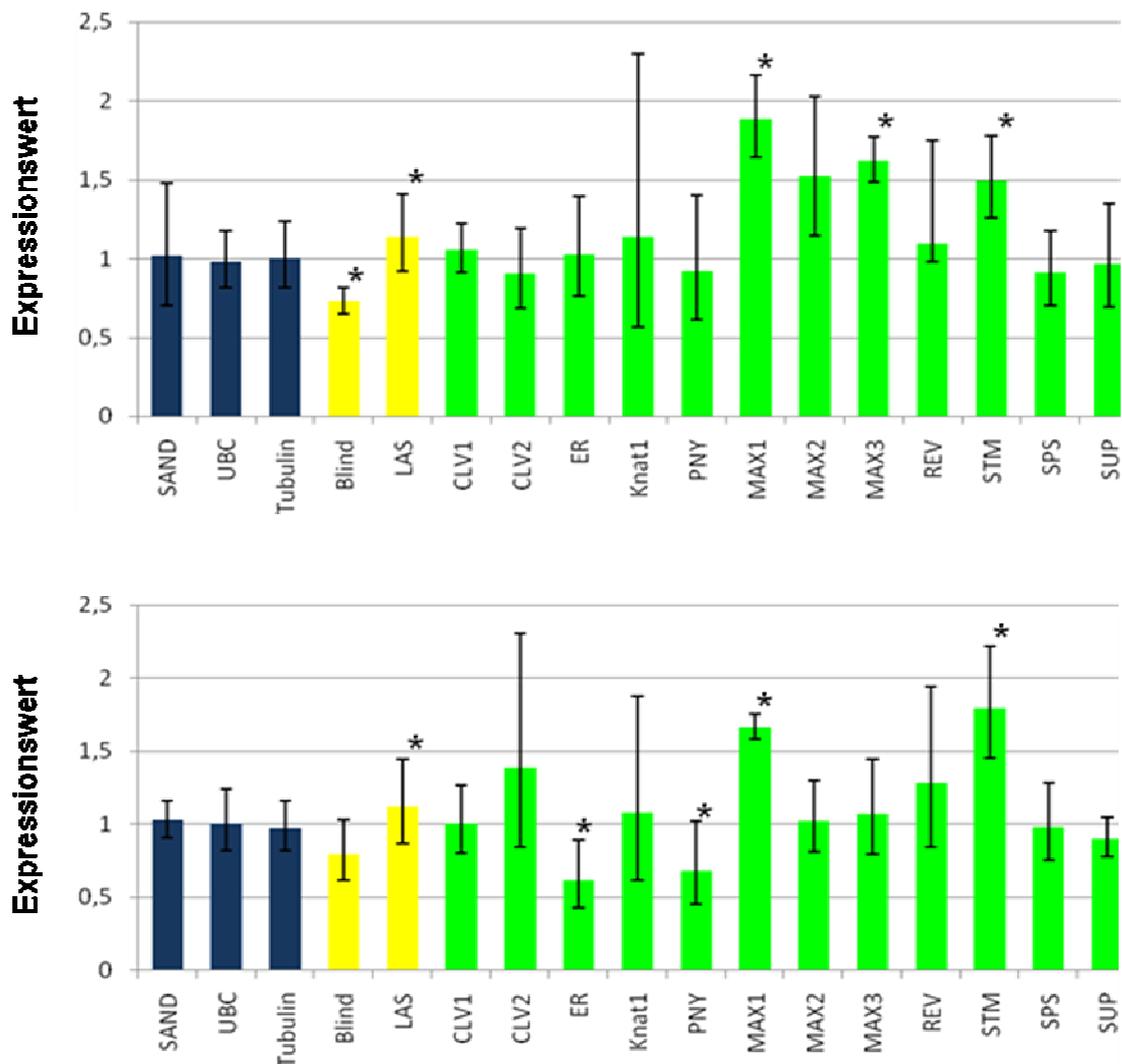


Abbildung 20: qRT PCR Ergebnisse für die Kandidatengene aus der Literatur. Als Kontrolle wurde der kompakte Klon 18 Gm verwendet, als zu testende Probe fungierte der lockerbeerige Klon 1–84 Gm. Im oberen Diagramm sind die Ergebnisse für das Entwicklungsstadium BBCH 57 abgebildet, unten die Ergebnisse für das Entwicklungsstadium BBCH 73. In der qRT – PCR weisen „fold – change“ – Werte >1 auf eine erhöhte Regulation hin und Werte <1 auf eine reduzierte Regulation. Die blauen Säulen stehen für die drei HKGs. Die gelben Säulen sind aus Tomaten abgeleitete Kandidatengene, die grünen Säulen Kandidatengene aus *Arabidopsis*. Mit Sternchen markierte Säulen sind im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm signifikant differentiell exprimiert. Die schwarzen Linien pro Säule stehen für den maximalen und den minimalen Expressionswert.

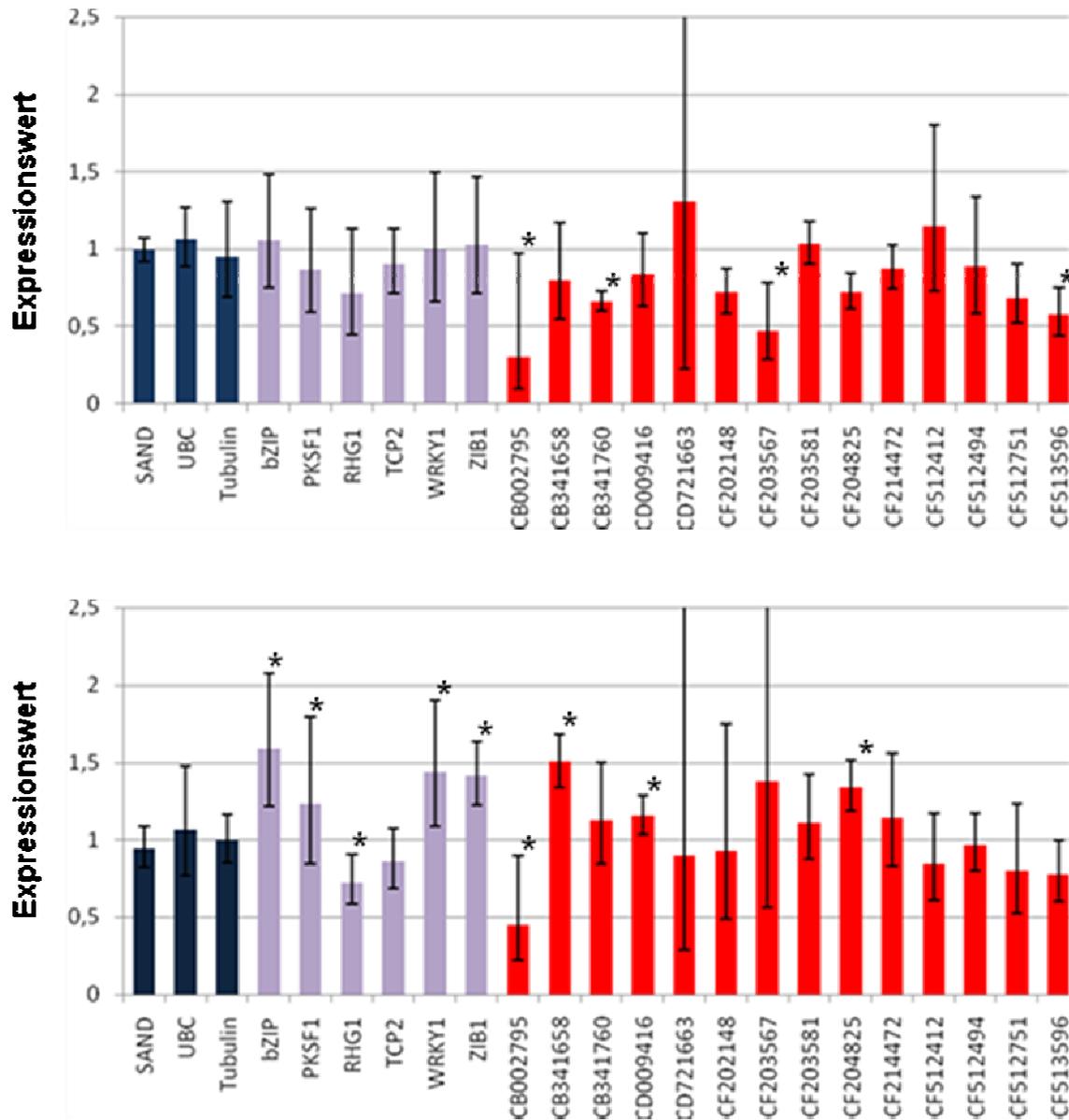


Abbildung 21: qRT – PCR Ergebnisse zur Verifizierung der Ergebnisse für die Kandidatengene aus den Microarray Hybridisierungen. Im oberen Diagramm ist das Entwicklungsstadium BBCH 57 abgebildet, unten das Entwicklungsstadium BBCH 73. Die blauen Säulen repräsentieren wieder die drei HKGs. Die violetten Säulen repräsentieren die Transkriptionsfaktoren und die roten Säulen die Kandidatengene mit unbekannter molekularer Funktion. Auch hier sind signifikante differentielle Expressionsunterschiede zwischen den beiden Klonen mit einem Sternchen markiert. Die schwarzen Linien pro Säule stehen für den maximalen und den minimalen Expressionswert.

In Abbildung 20 und 21 sind die Testergebnisse für die Kandidatengene aus der Literatur bzw. aus den Microarray Hybridisierungen zusammengefasst. Insgesamt konnten bei sieben von 14 Kandidatengenen aus der Literatur Expressionsunterschiede in mindestens einem Entwicklungsstadium zwischen den beiden Klonen detektiert werden. Von den 20 Kandidatengenen von der

Microarray Analyse konnten bei 12 Genen die Ergebnisse der Microarray Analyse bestätigt werden.

4.4.4 Real Time PCR Experiment – Kinetiken 2006

Um detailliertere Einblicke in das Expressionsmuster zu erlangen, wurde für jedes der 34 ausgewählten Gene eine Kinetik der Expression über die Vegetationsperiode 2006 erstellt (siehe Abbildungen 22 – 24). Dazu wurden sechs Entwicklungszeitpunkte so ausgewählt, dass die Makrostadien „Erscheinen der Blütenanlage“, „Blüte“ und „Fruchtentwicklung“ abgedeckt waren. Im Makrostadium „Erscheinen der Blütenanlage“ wurde das Mikrostromadium BBCH 57 „Gescheine sind vollständig ausgebildet“ gewählt. Vom Makrostadium „Blüte“ wurden die drei Mikrostromadien BBCH 61 (Beginn der Blüte), BBCH 65 (Vollblüte) und BBCH 69 (Ende der Blüte) gewählt. Vom Makrostadium „Fruchtentwicklung“ wurden die beiden Entwicklungszeitpunkte BBCH 73 (Beeren Erbsengröße) und BBCH 77 (Traubenschluss) gewählt. Für jedes Experiment wurden wiederum drei biologische und zwei technische Wiederholungen durchgeführt.

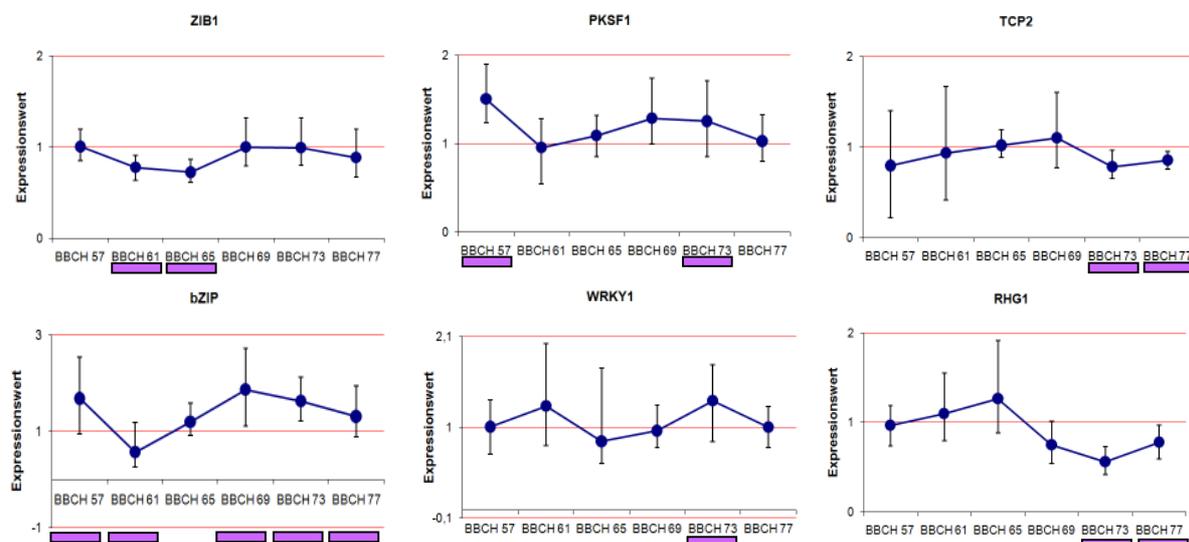


Abbildung 22: Kinetiken für die Kandidatengene aus den Microarray Hybridisierungen, die als Transkriptionsfaktoren annotiert sind. Der kompakte Klon 18 Gm diente als Kontrolle. Die blaue Linie stellt den Expressionsverlauf des jeweiligen Kandidatengens im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm dar. Die schwarzen Linien pro Säule stehen für den maximalen und den minimalen Expressionswert. Die Entwicklungsstadien, auf der x – Achse dargestellt, zu denen eine signifikant differentielle Expression zwischen den beiden `Spätburgunder`-Klonen detektiert werden konnte, sind mit einem lila Balken markiert.

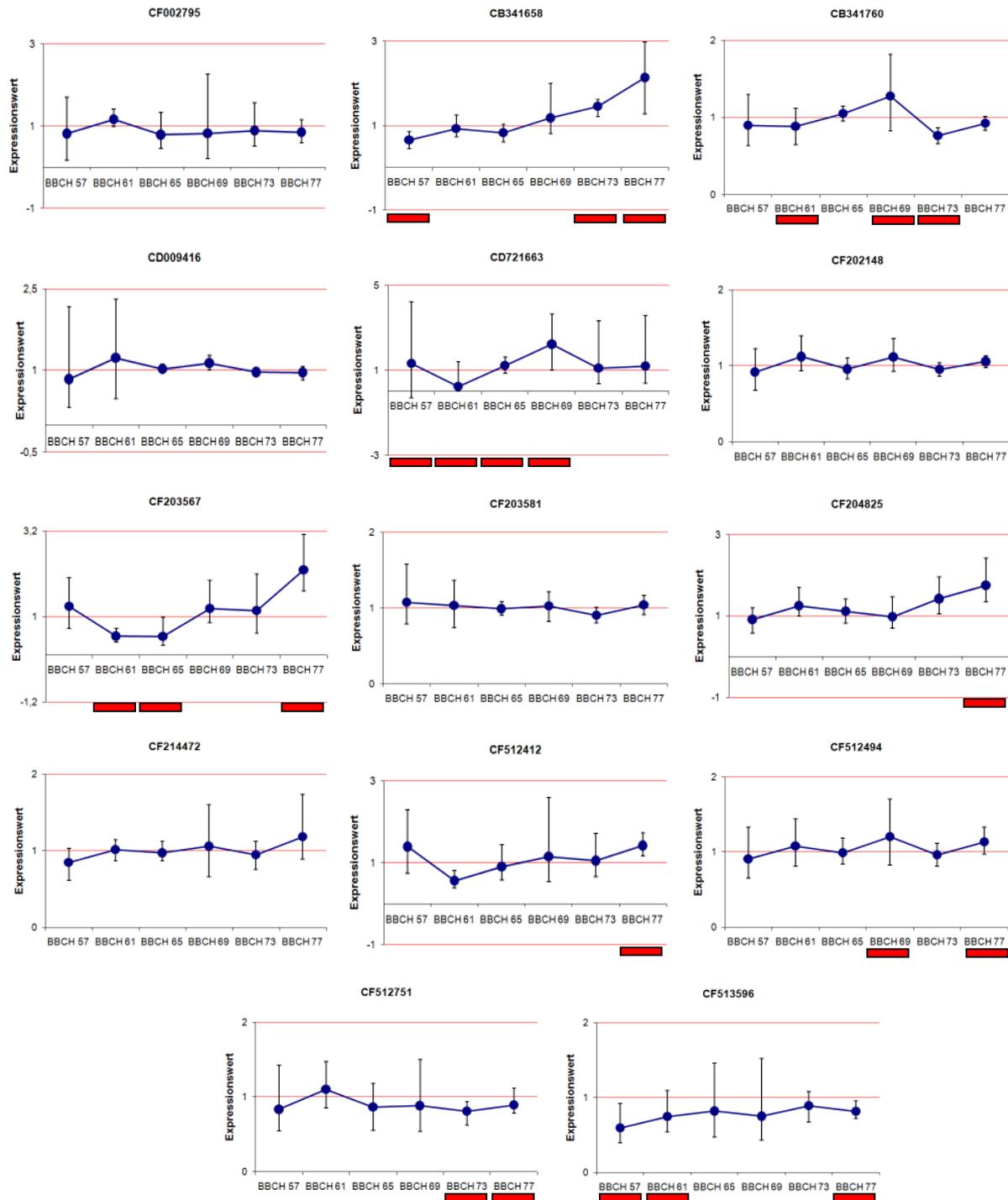


Abbildung 23: Kinetiken für die Kandidatengene unbekannter Funktion aus den Microarray Hybridisierung. Klon 18 Gm ist die Kontrolle. Die blaue Linie stellt den Expressionsverlauf des jeweiligen Kandidatengens im lockerbeerigen 'Spätburgunder'- Klon 1-84 Gm dar. Die schwarzen Linien pro Säule stehen für den maximalen und den minimalen Expressionswert. Rote Balken markieren signifikant differenzielle Expression.

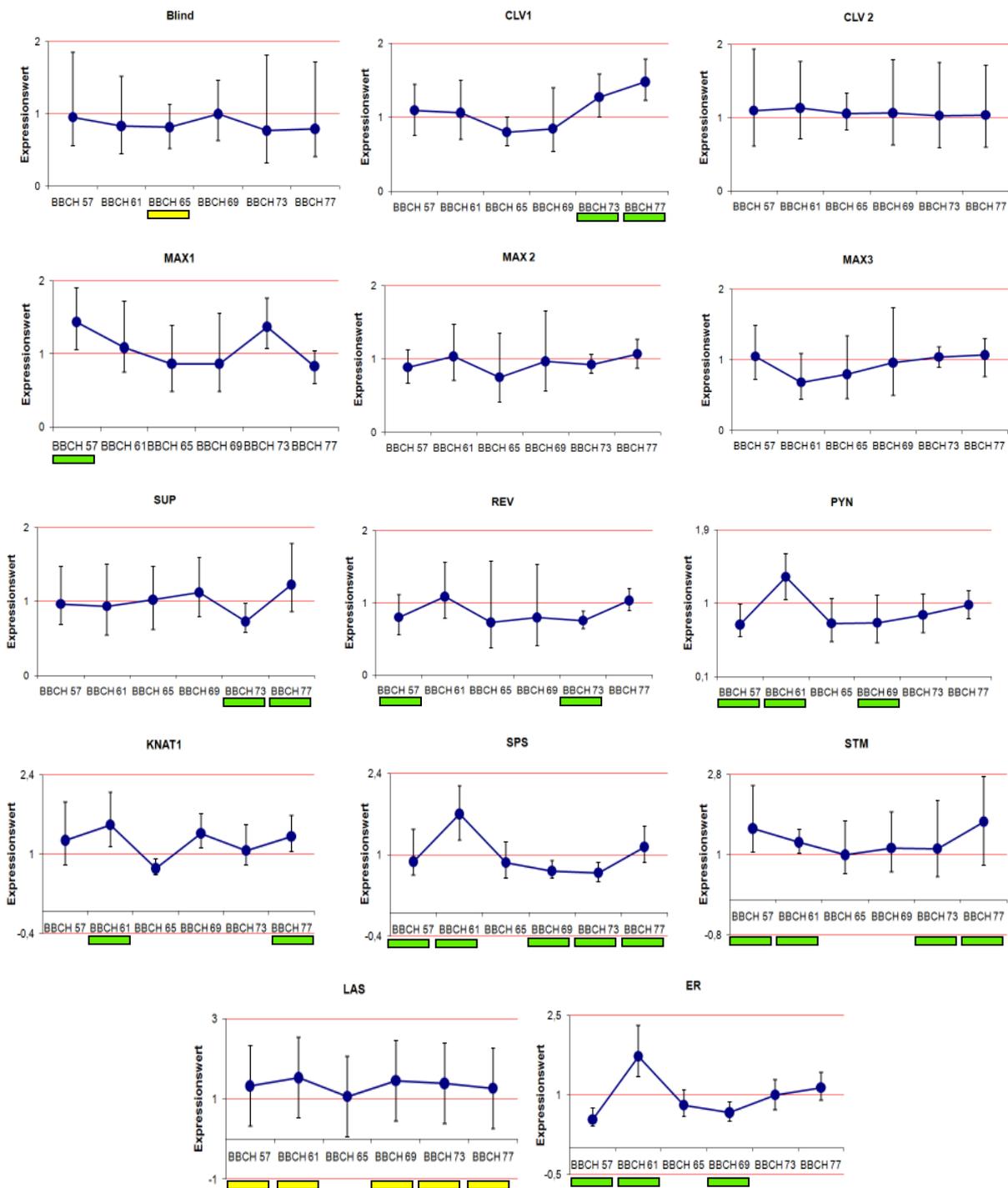


Abbildung 24: Kinetiken für die Kandidatengene aus der Literatur. Kontrolle Klon 18 Gm. Die blaue Linie stellt wieder den Expressionsverlauf im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm dar. Gelbe Balken markieren signifikante differentielle Expression in Genen aus der Tomate, grüne Balken in Genen aus *Arabidopsis*. Die schwarzen Linien pro Säule stehen für den maximalen und den minimalen Expressionswert.

Um eine mögliche Signifikanz der Expressionswerte feststellen zu können, wurde mit den Expressionswerten beider Klone ein t – Test durchgeführt. Die

Signifikanzschwelle ist bei $t = 0,05$ definiert. Ist das t – Test Ergebnis größer als diese Schwelle, gibt es keine signifikant differentielle Expression zwischen den beiden Klonen. t – Werte zwischen 0,05 und 0,01 zeigen eine signifikant differentielle Expression, t – Werte zwischen 0,01 und 0,001 zeigen eine hoch signifikant differentielle Expression und t – Werte kleiner als 0,001 eine höchst signifikant differentielle Expression an.

Insgesamt konnten in 26 Kandidatengenomen signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Klonen 18 Gm und 1–84 Gm detektiert werden. In der Tabelle 13 sind alle 34 getesteten Kandidatengene aufgelistet.

Tabelle 13: Übersicht der qRT PCR Ergebnisse der Kinetiken. Diese sind geordnet nach der Anzahl signifikant differentiell exprimierter Zeitpunkte (x = signifikant). Grün sind Gene aus *Arabidopsis*, gelb Gene aus der Tomate, violett die Transkriptionsfaktoren und rot Gene unbekannter Funktion.

Genbezeichnung	Entwicklungsstadien						Summe
	BBCH 57	BBCH 61	BBCH 65	BBCH 69	BBCH 73	BBCH 77	
SPS	x	x	-	x	x	x	5
LAS	x	x	-	x	x	x	5
bZIP	x	x	-	x	x	x	5
STM	X	x	-	-	x	x	4
CD721663	x	x	x	x	-	-	4
ER	x	x	-	x	-	-	3
PYN	x	x	-	x	-	-	3
CB341760	-	x	-	x	x	-	3
CF203567	-	x	x	-	-	x	3
CF512412	x	x	-	-	-	x	3
CF513596	x	x	-	-	-	x	3
CB341658	x	-	-	-	x	x	3
REV	x	-	-	-	x	-	2
CLV1	-	-	-	-	x	x	2
KNAT1	-	x	-	-	-	x	2
SUP	-	-	-	-	x	x	2
RHG1	-	-	-	-	x	x	2
PSKF1	x	-	-	-	x	-	2
ZIB1	-	x	x	-	-	-	2
TCP2	-	-	-	-	x	x	2
CF512494	-	-	-	x	-	x	2
CF512751	-	-	-	-	x	x	2
MAX1	x	-	-	-	-	-	1
BLIND	-	-	x	-	-	-	1
CF204825	-	-	-	-	-	x	1
WRKY1	-	-	-	-	x	-	1
MAX2	-	-	-	-	-	-	0
MAX3	-	-	-	-	-	-	0
CLV2	-	-	-	-	-	-	0
CF202148	-	-	-	-	-	-	0
CF203581	-	-	-	-	-	-	0
CD009416	-	-	-	-	-	-	0
CF214472	-	-	-	-	-	-	0
CF002795	-	-	-	-	-	-	0

Für jedes Kandidatengen wurden die Ergebnisse aus allen sechs getesteten Entwicklungsstadien zusammengestellt. Ein "x" steht für signifikant differentielle Expression im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm. Ein "-" steht für keine signifikante differentielle Expression. Als interessanteste Gene erwiesen sich SUPERSHOOT, LATERAL SUPPRESSOR und bZip. In diesen drei Kandidatengen konnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Klonen in fünf Entwicklungsstadien gefunden werden. Für die weiteren Analysen wurden insgesamt neun Kandidaten aus den Ergebnissen ausgewählt.

4.4.5 qRT PCR Experiment – Kinetiken 2007

4.4.5.1 Klonauswahl und Probennahme 2007

In der Vegetationsperiode 2007 wurde von insgesamt 7 Klonen (drei kompakte Klone und vier lockerbeerige Klone) Pflanzenmaterial an den Standorten, Geisenheim und Heppenheim gesammelt. Neben `Spätburgunder`- Klonen wurde zusätzlich Pflanzenmaterial von einem `Grauburgunder`- Klon (lockerbeerig) und von einem kompakten sowie einem lockerbeerigen `Chardonnay`- Klon gesammelt.

Ziel war es, die Gene, welche in den Experimenten von 2006 eine gesicherte differentielle Expression aufwiesen, an einem größeren Klonen – Spektrum sowie an Material von verschiedenen Standorten auf differentielle Expression zu testen. Vom Standort Geisenheim wurde Material von den drei `Spätburgunder`- Klonen 18 Gm, 1–84 Gm und INRA 777, vom `Grauburgunder`- Klon 1–30 Gm und von den beiden `Chardonnay`- Klonen 54 Gm und 1–45 Gm gesammelt. Vom Standort Heppenheim wurde von den vier `Spätburgunder`- Klonen 18 Gm , 1–84 Gm, INRA 777 und M242 Pflanzenmaterial gesammelt. An beiden Standorten wurden zu den drei Entwicklungszeitpunkten BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 73 beprobt.

4.4.5.2 Auswahl der Kandidatengene

Von den 34 Kandidatengen, für die Kinetiken ihres Expressionsmusters aus der Vegetationsperiode 2006 vorlagen, wurden neun Kandidatengene ausgewählt. Diese wurden ausgewählt, da sie in den Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 73 signifikant differentiiell exprimierten Entwicklungszeitpunkten waren

(vgl. Tabelle 13). Im einzelnen handelte es sich hierbei um die fünf Kandidatengene SPS, LAS, STM, REV und ER aus der Literatur und die vier Microarray basierenden Kandidatengene bZip, PKSF1, CD721663 und CB341658.

4.4.5.3 Ergebnisse Kinetiken 2007

Das Experiment wurde wie mit dem Material aus der Vegetationsperiode 2006 durchgeführt. In der folgenden Abbildung 25 sind die Kinetiken für die neun ausgewählten Kandidatengene abgebildet. Als Signifikanzschwelle für den t – Test wurde $t = 0,05$ festgelegt.

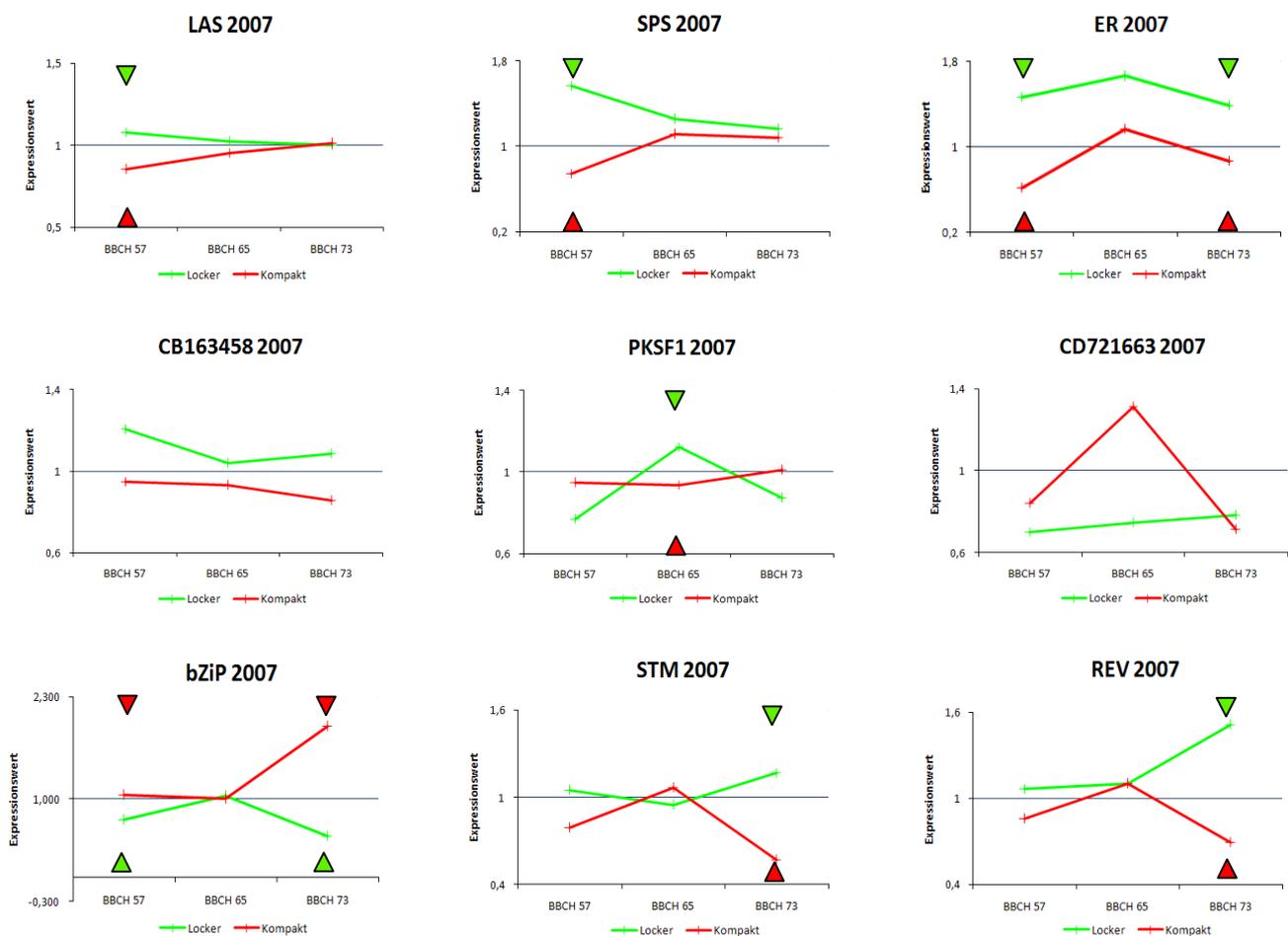


Abbildung 25: Kinetiken für die neun ausgewählten Kandidatengene mit dem Pflanzenmaterial aus dem Jahr 2007. Die Kinetik für die kompakten Klone ist rot dargestellt, für die lockerbeerigen Klone grün. In den mit Dreiecken markierten Entwicklungszeitpunkten konnte eine signifikant differentielle Genexpression zwischen den kompakten Klonen und den lockerbeerigen Klonen detektiert werden.

Insgesamt konnten bei sieben der neun Kandidatengene in mindestens einem Entwicklungsstadium ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den beiden Gruppen detektiert werden. Nur in den beiden Kandidatengenen CD721663 und CB341658 aus den Microarray Hybridisierungen konnte zu keinem Entwicklungsstadium eine signifikant differentielle Expression zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen festgestellt werden, somit konnten die Microarray Ergebnisse für diese Gene im erweiterten Klonen – Spektrum nicht bestätigt werden.

In Tabelle 14 sind für jedes Gen die differentiell exprimierten Entwicklungszeitpunkte mit dem dazugehörigen t – Wert und der Regulation in den beiden Klengruppen aufgelistet.

Tab. 14: Darstellung aller signifikant differentiell exprimierter Zeitpunkte. Rot ist die Regulation in den kompakten Klonen markiert, grün in den lockerbeerigen Klonen.

Gen	BBCH 57	Regulation	BBCH 65	Regulation	BBCH 73	Regulation
LAS	0,0004	↓ ↑	-	-	-	-
SPS	0,00006	↓ ↑	-	-	-	-
ER	0,005	↓ ↑	-	-	0,0005	↓ ↑
PKSF1	-	-	0,009	↓ ↑	-	-
bZIP	0,007	↓ ↑	-	-	0,000007	↓ ↑
STM	-	-	-	-	0,018	↓ ↑
REV	-	-	-	-	0,037	↓ ↑

Auffällig war, dass sich die `Chardonnay`- Klone, bei denen der `Burgunder` ein Elternteil ist, in ihrer Expression bei einigen Genen im Vergleich zu den `Spätburgunder`- Klonen und dem `Grauburgunder`- Klon unterscheiden.

4.4.6 qRT PCR Experiment – Kinetiken 2008

In der Vegetationsperiode 2008 wurde das qRT PCR Experiment von 2007 wiederholt. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der Kinetiken für 2008 dargestellt. Im Versuchsjahr 2008 konnten bei sechs der neun Kandidatengene eine signifikant differentielle Expression zu mindestens einem Entwicklungsstadium zwischen den beiden Gruppen detektiert werden. Neben den beiden Genen CD721660 und CB341658, bei denen schon im Versuchsjahr 2007 keine signifikanten Expressionsunterschiede festzustellen waren, konnte diesmal auch beim Gen PKSF1 kein signifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen den beiden Gruppen gefunden werden.

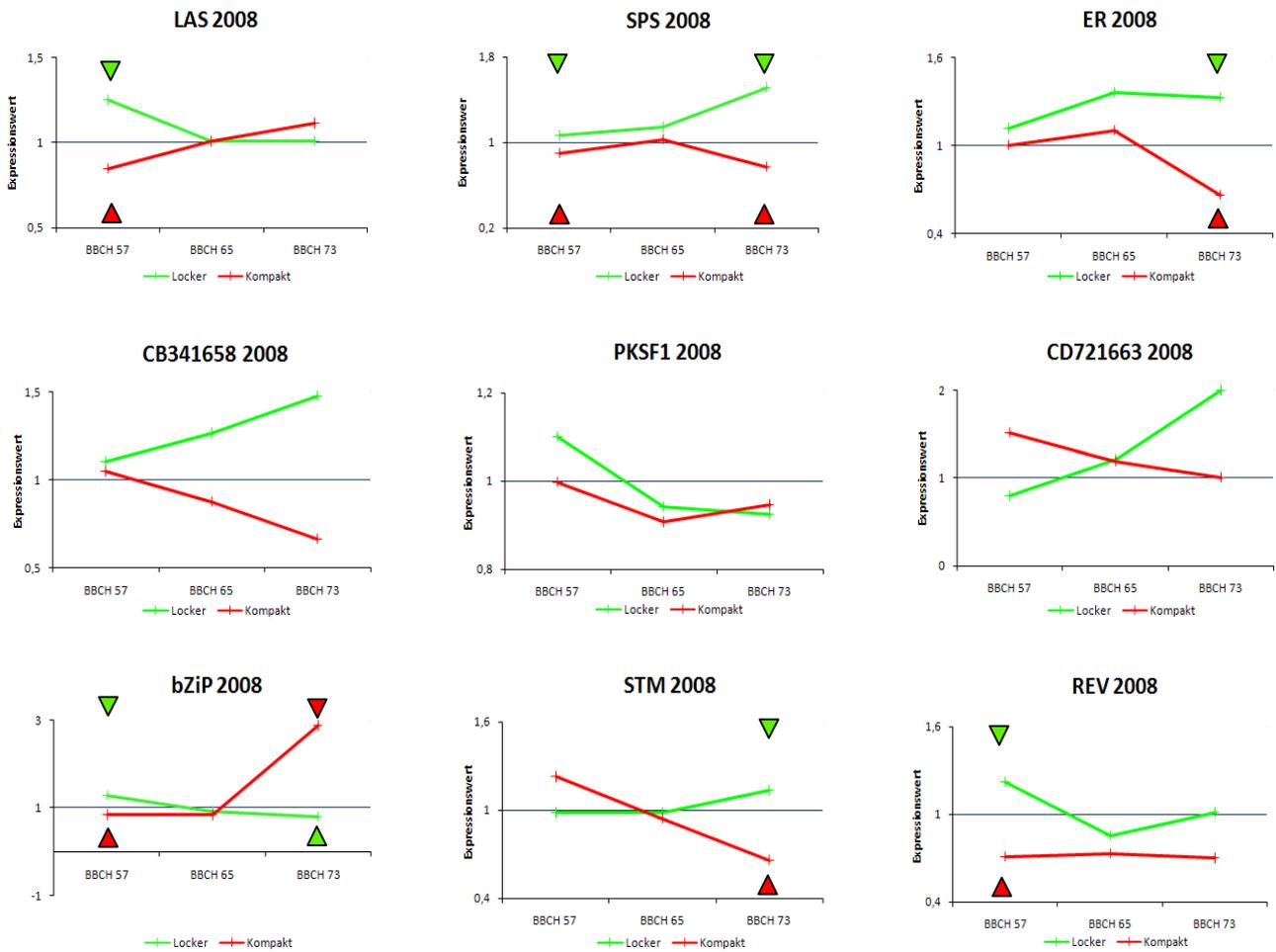


Abbildung 26: Kinetiken 2008 für die neun ausgewählten Kandidatengene. Die Kinetik für die kompakten Klone ist rot dargestellt, für die lockerbeerigen Klone grün. In den mit Dreiecken markierten Entwicklungszeitpunkten konnte eine signifikant differentielle Genexpression zwischen den kompakten Klonen und den lockerbeerigen Klonen detektiert werden.

Von den insgesamt neun gefundenen signifikant differentiel exprimierten Zeitpunkten 2008 bestätigten fünf die Ergebnisse aus dem Versuchsjahr 2007 (siehe Tabelle 15, blau unterlegt).

Tab. 15: t- Werte der signifikant differentiel exprimierten Zeitpunkte 2008. Rot markiert sind die kompakten Klone, grün die lockerbeerigen Klone. Blau unterlegt sind die Zeitpunkte, welche die Ergebnisse aus dem Versuchsjahr 2007 bestätigten.

Gen	BBCH 57	Regulation	BBCH 65	Regulation	BBCH 73	Regulation
LAS	0,0002	↓ ↑	-	-	-	-
SPS	0,009	↓ ↑	-	-	0,0003	↓ ↑
ER	-	-	-	-	0,002	↓ ↑
bZip	0,0002	↓ ↑	-	-	0,001	↓ ↑
STM	-	-	-	-	0,009	↓ ↑
REV	0,045	↓ ↑	-	-	-	-

Im Entwicklungsstadium BBCH 65 konnte im Versuchsjahr 2008 kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Die beiden `Chardonnay`- Klone zeigten wie in den Versuchen des Jahres 2007 in ihrer Expression bei einigen Genen im Vergleich zu den `Spätburgunder`- Klonen und dem `Grauburgunder`- Klon Unterschiede.

4.4.7 Vergleich 2007 mit 2008

Ziel der qRT PCR Experimente war es, die Kandidatengene zu identifizieren, die Umwelt unabhängig (Standort, Versuchsjahr) eine gesicherte differentielle Expression zwischen den lockerbeerigen und den kompakten Klonen zeigten. Hierzu wurden die Ergebnisse der Versuchsjahre 2007 und 2008 miteinander verrechnet und mit dem t – Test auf Signifikanz überprüft. Als Signifikanzschwelle wurde $t = 0,05$ festgelegt.

Tabelle 16: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Kinetiken aus den Versuchsjahren 2007 und 2008. Grün unterlegt sind Kandidatengene aus *Arabidopsis*, gelb Gene aus der Tomate, violett die Transkriptionsfaktoren und rot Gene mit unbekannter molekularer Funktion (xxx = höchst signifikant, xx = hoch signifikant und x = signifikant).

Gen	2007			2008		
	BBCH 57	BBCH 65	BBCH 73	BBCH 57	BBCH 65	BBCH 73
SPS	xxx	-	-	xx	-	xxx
LAS	xxx	-	-	xxx	-	-
bZIP	xx	-	xxx	xxx	-	xx
STM	-	-	x	-	-	xx
CD721663	-	-	-	-	-	-
CB341658	-	-	-	-	-	-
REV	-	-	x	x	-	-
PSKF1	-	xx	-	-	-	-
ER	xx	-	xxx	-	-	xx

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der beiden Versuchsjahre abgebildet. Drei "xxx" stehen für eine höchst signifikant differentielle Expression dieses Gens in diesem Entwicklungsstadium zwischen den fünf lockerbeerigen und den fünf kompakten Klonen. Zwei "xx" stehen für eine hoch signifikant differentielle Expression und ein "x" für eine signifikant differentielle Expression.

Als Ergebnis sieht man deutlich, das bei den zwei Kandidatengenen CD721663 und CB341658 zu keinem der drei Entwicklungsstadien in beiden Versuchsjahren

eine signifikant differentielle Expression zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen detektiert werden konnte. Für das Kandidatengen PKS1 konnte im Jahr 2007 eine hoch signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 65 festgestellt werden, diese bestätigten sich jedoch nicht im Versuchsjahr 2008. Die Kandidatengene CD721663, CB341658 und PKS1 wurden deshalb in den weiteren Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt.

4.4.7.1 Vergleich der Standorte Geisenheim und Heppenheim

Um die Frage zu klären, ob verschiedene Standorte und damit unterschiedliche klimatische Bedingungen einen Einfluss auf die Expression der Kandidatengene haben, wurde Pflanzenmaterial von zwei verschiedenen Standorten, Geisenheim und Heppenheim, für die drei Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 73 von den drei 'Spätburgunder' – Klonen 18 Gm, 1–84 Gm und INRA 777 in den Versuchsjahren 2007 und 2008 genommen. Mittels qRT PCR wurden für jedes Kandidatengen die Expressionswerte in den einzelnen Entwicklungsstadien in beiden Versuchsjahren an den beiden Standorte bestimmt. Diese Expressionswerte wurden mittels eines t – Testes für jeden Klon auf mögliche Signifikanz der differentiellen Expression zwischen den beiden Standorten zu allen Entwicklungsstadien und zwischen den beiden Versuchsjahren getestet. Die Signifikanzschwelle lag bei $t = 0,05$.

Die Gene LAS, SPS, ER und STM zeigten keine signifikanten Genexpressionsunterschiede zwischen den beiden Standorten in beiden Versuchsjahren. Für REV wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Standorten im Entwicklungsstadium BBCH 73 gefunden. bZIP zeigte einen signifikanten Unterschied im Entwicklungsstadium BBCH 57 zwischen den beiden Versuchsjahren.

4.4.7.2 Vergleich der beiden Versuchsjahre 2007 und 2008

Nachdem die Expression der sechs Kandidatengene für beide Standorte und Jahre auf mögliche signifikante Unterschiede getestet worden war, folgte im nächsten Schritt der Vergleich der kompakten mit den lockerbeerigen Klonen über die Versuchsjahre 2007 und 2008.

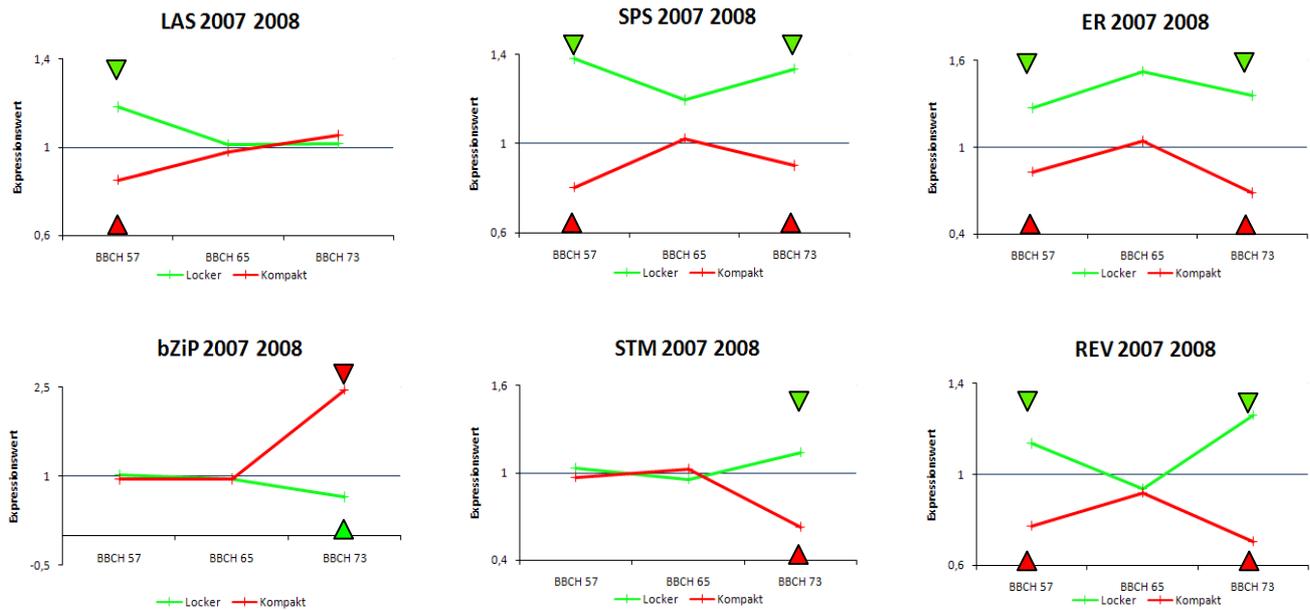


Abbildung 27: Kinetiken der Jahre 2007 + 2008 für die sechs ausgewählten Kandidatengene. Kompakten Klone = rot, lockerbeerigen Klone = grün. Dreiecke markieren signifikant differentielle Genexpression zwischen kompakten Klonen und lockerbeerigen Klonen.

Nach Verrechnung der beiden Versuchsjahre 2007 und 2008 konnte für alle sechs Gene eine signifikant differentielle Genexpression zwischen den beiden Gruppen der Klone nachgewiesen werden (siehe Tabelle 17).

Tab. 17: t- Werte der Versuchsjahre 2007 + 2008. Rot = Regulation in kompakten Klone, grün = Regulation in lockerbeerigen Klonen. Blau unterlegt = Ergebnisse, welche die einzelnen Versuchsjahre bestätigen

Gen	BBCH 57	Regulation	BBCH 65	Regulation	BBCH 73	Regulation
LAS	0,000002	↓ ↑	-	-	-	-
SPS	0,001	↓ ↑	-	-	0,008	↓ ↑
ER	0,015	↓ ↑	-	-	0,0002	↓ ↑
bZiP	-	-	-	-	0,00002	↓ ↑
STM	-	-	-	-	0,012	↓ ↑
REV	0,012	↓ ↑	-	-	0,01	↓ ↑

Bei den fünf Genen LAS, SPS, ER, bZiP und STM konnte jeweils ein signifikant differentiiell exprimierter Entwicklungszeitpunkt detektiert werden. Es wurde gezeigt, dass diese Unterschiede weder abhängig von Standort noch vom Versuchsjahr waren.

Es konnten zwei weitere SNPs an den Positionen 393 bp und 808 bp gefunden werden, die sich aber nicht zwischen lockerbeerigen und kompakten Klonen unterscheiden.

In Tabelle 18 sind alle 14 SNPs aufgelistet, die in den vier *Arabidopsis* Kandidatengen SPS, STM, ER und REV gefunden werden konnten. Die SNP – Frequenz in den einzelnen Sequenzen lag zwischen 1/200 bp (STM) und 1/500 bp (ER). Acht dieser SNPs (grün) sind eindeutig mit der Merkmalsausprägung der Fruchtstandstruktur in den beiden Klongruppen assoziiert.

Tabelle 18: Die 14 SNPs in den Promotorsequenzen der homologen Gene SPS, ER, STM und REV von *Vitis vinifera*. Grün unterlegt sind die SNPs, die eindeutig mit der Merkmalsausprägung der Fruchtstandstruktur in den beiden Klongruppen (l = lockerbeerig; k = kompakt) assoziiert sind.

	Position	l	k												
SPS	246	T	C	393	G	A	632	T	A	808	G	A			
ER	187	-	C	188	-	A									
STM	183	A	C	193	A	-	194	C	-	670	G	A	694	A	T
REV	241	C	T	487	-	T	592	C	T						

Bei allen Kandidatengen wurde der mögliche Promotorbereich im Probensatz zur Repräsentanz der unterschiedlichen Ausprägung der Lockerbeerigkeit sequenziert. Innerhalb des Probensatzes gibt es einen kleineren Satz an Sorten und Klonen, die alle zur `Pinot´ Familie gehören, bzw. die `Pinot´ im genetischen Hintergrund besitzen.

In Abbildung 29 ist derselbe Sequenzabschnitt von SPS für diesen kleineren Probensatz abgebildet. Neben den oben bereits beschriebenen SNPs, konnten zwei weitere SNPs (201 bp und 401 bp) gefunden werden. An Position 201 bp besitzen die drei Sorten `Räuschling´, `Silvaner´ und `Grauburgunder´ ein T anstelle eines C und an Position 401 bp besitzen `Räuschling´ und `Silvaner´ ein G anstelle eines A. Im Satz `Pinot´ wurden insgesamt in allen vier Promotorenbereichen zehn weitere SNPs gefunden. Es konnten aber keine weiteren SNPs gefunden werden, die eindeutig mit locker und kompakt assoziiert waren (siehe Anhang).

		201		300
Räuschling	(115)	TGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
1-84 Gm Hm	(201)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
1-84 Gm Gm	(201)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
M242 Hm	(201)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
1-30 Gm Gm	(163)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
1-45 Gm Gm	(154)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
Riesling	(171)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
Silvaner	(201)	TGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
Grauburgunder	(161)	TGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
Schwarzriesling	(123)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
Dakapo	(96)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
St. Laurent	(96)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
18 Gm Gm	(82)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
18 Gm Hm	(94)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
INRA 777 Gm	(98)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
54 Gm Gm	(96)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTGGAGAAAAACACCAAGTTGAAAATTA	TCCACTGAAGCAACTGTCACITGTCCA	
		301		400
Räuschling	(215)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
1-84 Gm Hm	(301)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
1-84 Gm Gm	(301)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
M242 Hm	(301)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
1-30 Gm Gm	(263)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
1-45 Gm Gm	(254)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
Riesling	(271)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
Silvaner	(301)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
Grauburgunder	(261)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
Schwarzriesling	(223)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
Dakapo	(196)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
St. Laurent	(196)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
18 Gm Gm	(182)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
18 Gm Hm	(194)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
INRA 777 Gm	(198)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	
54 Gm Gm	(196)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATAACCCGGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGA	TTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATATATAGCA	

Abbildung 29: Ausschnitt aus der Sequenz des mutmaßlichen Promotorbereiches des Kandidatengens SPS für den Probensatz `Pinot`. Grün = lockerbeerige Klone und Sorten, violett = intermediäre Sorten und rot = kompakte Klone und Sorten. Neben den bereits zuvor identifizierten SNPs an Position 246 bp und 393 bp konnte ein weiterer SNP an Position 201 gefunden.

4.5.2 Ergebnisse der Sequenzierung nach der Klonierung allelischer Varianten

Für die Kandidatengene bZiP und LAS konnte das PCR – Amplifikat nicht erfolgreich direkt sequenziert werden. Dies deutet auf eine ausgeprägte Heterozygotie mit zwei verschiedenen Allelen hin. Aus diesem Grund wurden die PCR – Produkte unter Verwendung des Klonierungskits „TOPO TA Cloning® for Sequencing“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) kloniert. Anschließend wurden die klonierten Fragmente sequenziert. Für bZiP wurden zwischen den Allelen zwei Deletionen detektiert (Abbildung 30), die eindeutig zwischen kompakten und lockerbeerigen Klonen differenzieren. Beim Kandidatengen LAS wurden keine Unterschiede in den allelischen Sequenzen der beiden Klongruppen gefunden.

In den vier Genen SPS, ER, STM und bZiP wurden Sequenzunterschiede in den mutmaßlichen Promotorbereichen gefunden, die eindeutig mit kompakt und locker assoziiert sind. Dies bestätigt auch die Ergebnisse der Genexpressionsstudien, bei denen für diese vier Gene mindestens ein signifikant exprimierter Entwicklungszeitpunkt über die Versuchsjahre gefunden werden konnte.

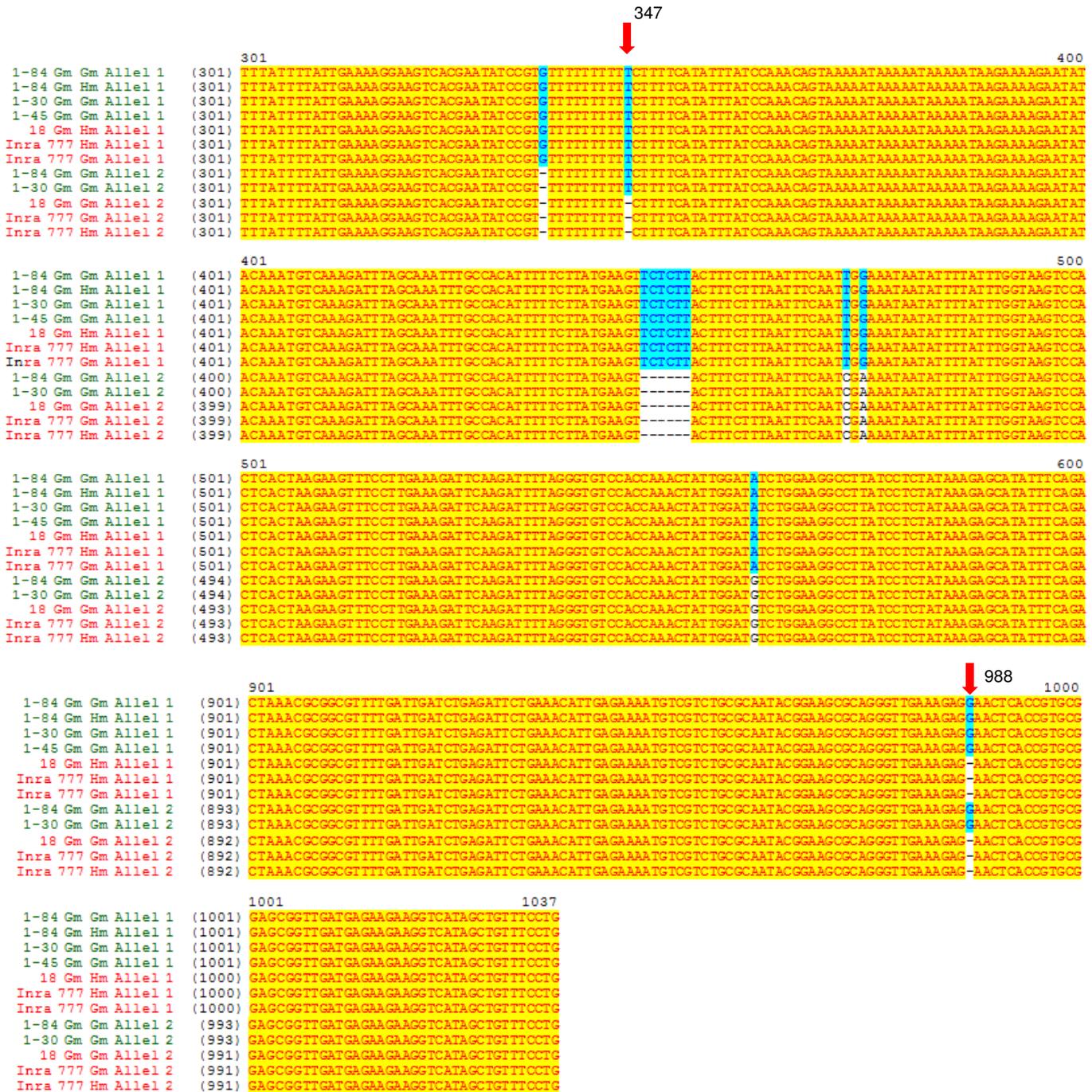


Abbildung 30: Sequenzausschnitt des mutmaßlichen Promotorbereiches des Kandidatengens bZiP im Probenzart der lockerbeerigen Klone (grün) im Vergleich zu den kompakten Klone (rot). An Position 347 bp ist eine Deletion im Allel 2 der kompakten Klone zu finden. An Position 988 bp ist eine Deletion in beiden Allelen der kompakten Klone zu beobachten.

5 Diskussion

Mit den durchgeführten Analysen wurde ein erster Beitrag zur Aufklärung des Merkmals Lockerbeerigkeit geleistet werden. Es konnten vier Gene SPS, ER, STM und bZiP als mögliche Kandidatengene für Lockerbeerigkeit identifiziert werden, da diese sowohl Genexpressions- als auch Sequenzunterschiede in den mutmaßlichen Promotorbereichen zwischen kompakten und lockerbeerigen Klonen aufwiesen.

5.1 Microarray Hybridisierungen

Es wurden Genexpressionsstudien während der Entwicklung der Infloreszenzen und des Fruchtstandes bei 'Spätburgunder' mittels Microarray Hybridisierungen auf dem Affymetrix GeneChip® für *Vitis vinifera* durchgeführt. Auf diesem Microarray sind ca. 14.000 Transkripte von *Vitis vinifera* und 1.700 Transkripte anderer *Vitis* Arten gespottet. Ziel dieser Studien war es, in einem umfassenden Ansatz differenziell exprimierte Gene zwischen dem kompakten 'Spätburgunder' – Klon 18 Gm und dem lockerbeerigen 'Spätburgunder' – Klon 1–84 Gm zu identifizieren.

5.1.1 Microarray Technologie

Die Microarray Technologie ermöglicht die Analyse der Transkriptionsmuster von tausenden von Genen in einem einzelnen Experiment (Schena et al. 1995; Schena et al. 1996; Lockhart et al. 1996). Diese Technik ist in der Anwendung jedoch mit Einschränkungen verbunden. Durch unterschiedliche Technologien und Methoden lassen sich die Ergebnisse methodisch verschiedener Experimente nicht immer direkt vergleichen.

Mills et al. beschreiben, dass signifikante Unterschiede in Microarray – Ergebnissen verschiedener Experimente, besonders bei Genen mit niedrigem Expressionsmuster auftreten können. Um diese Variabilität einzugrenzen, sind mehrere Versuchswiederholungen unumgänglich (Mills et al. 2001). Aufgrund der hohen Kosten und der komplexen Datenauswertung kann diese Forderung allerdings oft nur bedingt umgesetzt werden.

Experimente mit Microarrays enthalten zahlreiche potentielle Fehlerquellen, wie heterogene RNA – Qualität, cDNA – Bibliotheken mit falschen Genen (Sequenzen können aus Bibliotheken stammen, die bis zu 5 % fehlerhafte Annotationen

haben), Artefakte als Fehlerquelle, Kreuzhybridisierung zwischen ähnlichen Sequenzen und fehlerhafte Messungen der Intensitäten (Koizumi, 2004).

Daher ist es nicht möglich, ohne weiteres aus einer einzigen Microarray-Genexpressionsanalyse abschließende Schlussfolgerungen zu ziehen. Dies erfordert eine Validierung an ausgewählten Genen anhand alternativer Methoden, wie z.B. Northern – Blot Hybridisierungsanalysen, *In Situ* Hybridisierung (Parker und Barnes, 1999), RNase Protektionstests (Hod, 1992; Saccomanno et al. 1992) oder quantitativer Real Time PCR (Bustin, 2000). In dieser Arbeit wurden die Microarray - Ergebnisse mittels qRT PCR validiert.

5.1.2 Einsatz der Real Time PCR zur Validierung der Microarray Genexpressionsdaten

Die Validierung von Microarray Genexpressionsdaten erfordert ein Verfahren mit hoher Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit. Diese Anforderungen werden durch die quantitative Real Time PCR erfüllt (Bustin, 2002; Ginzinger, 2002). Grundsätzlich weist die qRT PCR gegenüber den anderen mRNA Quantifizierungsverfahren wie Northern – Blot, RNase Protektionstests und *In Situ* Hybridisierung Vorteile bezüglich der Geschwindigkeit, der einfachen Durchführbarkeit, der Automatisierbarkeit, des hohen Probendurchsatzes und der Nachweisgrenze auf.

Ferner lassen sich fast alle biologischen Gewebe als Ausgangsmaterial nutzen, wobei nur kleinste Mengen benötigt werden (Radonic et al. 2004). Die Real Time PCR ist somit die Methode der Wahl, um mit höchster Sensitivität bei vertretbarem Arbeitsaufwand eine Quantifizierung von RNA – Molekülen durchzuführen (Wong et al. 2005).

Die Validierung von Microarray Genexpressionsdaten mit etablierten mRNA Quantifizierungstechniken ist ein notwendiges und anerkanntes Verfahren (Chuaqui et al. 2002). Die Zahl der Arbeiten, die Microarray Genexpressionsdaten mit der Real Time PCR validieren, steigt stetig an (Rajeevan et al. 2001). In einer Arbeit analysierten Coller et al. (1999) die Microarray Genexpressionsdaten an 6 ausgewählten Genen mittels Northern – Blot Verfahren. Alle untersuchten Gene wurden als reguliert bestätigt. Jenson et al. (2003) analysierten ebenfalls mit dem Microarray Verfahren die Expressionsprofile von circa 4500 Genen an Zelllinien. Die differentiell exprimierten Gene wurden mit der quantitativen Real Time PCR

validiert und es konnte eine Übereinstimmung der Expressionsergebnisse bei der 75 % untersuchten Gene in zwischen beiden Methoden beobachtet werden. Weitere Literaturquellen zeigen ähnliche Ergebnisse, wie z.B. die Publikation von Rajeevan et al. (2001). In dieser Arbeit wurden Microarray Genexpressiondaten an 24 ausgewählten Genen mit der SYBR Green Real Time PCR analysiert. In 71 % der Fälle (17 von 24) wurden die gefundenen Gene als reguliert verifiziert. Ferner konnten Mutch et al. (2002) eine Übereinstimmung der Expressionsergebnisse beider Methoden in 86 % der untersuchten Gene feststellen.

5.1.3 Eigene Microarray Ergebnisse

Mittels Microarray Hybridisierungen wurde Pflanzenmaterial des kompakten `Spätburgunder`- Klons 18 Gm und eines lockerbeerigen `Spätburgunder`- Klons 1-84 Gm in drei Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 73 verglichen, um interessante Kandidatengene, die möglicherweise an der Ausprägung der Traubenmorphologie beteiligt sind, zu identifizieren. Zusätzlich wurden die beiden `Spätburgunder`- Klone mit der lockerbeerigen Tafeltraube `Cardinal` im Entwicklungsstadium BBCH 65 verglichen.

Gene aus den Microarray Experimenten mit einem p – Wert unter 0,05 und einem höheren „fold – change“ Wert als 1,0 wurden hierbei als differentiell exprimiert angesehen. Insgesamt konnten in den vier verschiedenen Experimenten 4052 solcher Gene identifiziert werden. Analysiert man die Ergebnisse nur aufgrund des p – Wertes, ergeben sich für die Vergleiche der beiden `Spätburgunder`- Klone Expressionsunterschiede in ca. 6,5 % aller auf dem Microarray gespotteten Transkripte. Im Vergleich der beiden Klone mit der Tafeltraube `Cardinal` (BBCH 65) erscheinen sogar 10 % der Gene differentiell exprimiert. Aus diesem Grund ist es wichtig, den „fold change“ – Wert in die Analyse mit einzubeziehen. Analysiert man alle Gene, die einen größeren „fold change“ – Wert als $\pm 1,5$ aufweisen, sind im Stadium BBCH 57 1,8% und im Stadium BBCH 73 1,1% der Gene zwischen den beiden `Spätburgunder`- Klonen differentiell exprimiert. Im Vergleich der beiden Klone mit `Cardinal` erschienen 5,5% der Gene differentiell exprimiert. Analysiert man nun die Ergebnisse der Gene, die einen größeren „fold change“ – Wert als ± 2 aufweisen, sinkt die Anzahl der Gene, die differentiell exprimiert erscheinen für BBCH 57 auf 1,3% , für BBCH 65 auf 2,5 % und für BBCH 73 auf 0,5%. Insgesamt kann man festhalten, dass die Anzahl der differentiell exprimierten Gene zu einem bestimmten Entwicklungsstadium zwischen den

beiden Klonen geringer ist, als die Anzahl im Vergleich der beiden Sorten was der Erwartungshaltung entsprach. Der genetische Unterschied zwischen Sorten ist größer als zwischen Klonen.

Die Microarray Technologie kann somit als 'Screening' – Verfahren zum Identifizieren von Kandidatengenen eingesetzt werden. Jedoch müssen Gene von besonderem Interesse, die durch statistische Verfahren ermittelt werden konnten, durch ausreichend sensitive und spezifische Expressionsanalysetechniken, wie die quantitative Real Time PCR bestätigt werden. Die qRT PCR ist als schnelles, robustes, spezifisches und sensitives Verfahren sehr gut geeignet, um Microarray – Expressionsdaten zu analysieren (Rajeevan et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden differentiell exprimierte Microarray Genexpressionsdaten von sechs ausgewählten Genen, die als Transkriptionsfaktoren agieren und 14 ausgewählten Kandidatengenen, deren molekulare Funktion nicht bekannt ist, unter Verwendung der qRT PCR untersucht. Bei den Transkriptionsfaktoren konnten bei fünf von sechs Genen (83%) die Microarray Ergebnisse mittel qRT PCR bestätigt werden, bei den Genen mit unbekannter Funktion bei sieben von 14 (50%). Insgesamt konnten bei 60 % der getesteten Kandidatengene die Ergebnisse der Microarray Hybridisierung mittels qRT PCR bestätigt werden.

5.2 Untersuchte Kandidatengene aus der Literatur

Neben dem Vorteil tausende Gene in einen Experiment simultan untersuchen zu können, hat die Microarray Hybridisierung einen entscheidenden Nachteil. Es können nur die Transkripte untersucht werden, die auf dem Chip gespottet sind. Im Rahmen dieser Arbeit stand ein Chip der Firma Affymetrix zur Verfügung, der nur knapp die Hälfte der Gene von *Vitis vinifera* repräsentierte. Mit der ersten Genomsequenzierung des Rebgenoms der 'Spätburgunder' – Inzuchtlinie PN40024 (Jaillon et al. 2007) und der Rebsorte 'Spätburgunder' (Velasco et al. 2007) ist der erste Schritt gemacht, alle ca. 30.000 Gene der Weinrebe in naher Zukunft zu identifizieren. Bald wird es eine Neuauflage des GeneChip® *Vitis vinifera* geben, auf dem ein größerer Anteil aller Gene repräsentiert wird.

Aus diesem Grund wurden zusätzlich Kandidatengene, die bekanntermaßen Merkmale ähnlich der Lockerbeerigkeit z.B. in *Arabidopsis thaliana* oder der Tomate beeinflussen, aus der Literatur abgeleitet. Insgesamt wurden 14 Kandidatengene ausgewählt, die z.B. das Längenwachstum beeinflussen, so wie

ERECTA (Torii et al. 1996), SUPERSHOOT (Tatikanjana et al. 2001), für die Regulierung des Blütenmeristems wie BLIND (Schmitz et al. 2002) oder des lateralen Meristems wie z.B. REVOLUTA (Talbert et al. 1995), LATERAL SUPPRESSOR (Greb et al. 2003) verantwortlich sind. Die Kandidatengene wurden nach Abgleich mit der öffentlich zugänglichen `Spätburgunder´ Genomsequenz mittels qRT PCR auf differentielle Genexpression zwischen den beiden `Spätburgunder´- Klonen 18 Gm und 1–84 Gm analog der Microarray Hybridisierungen in den Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 73 untersucht. Die orthologen Sequenzen der Kandidatengene in *Vitis vinifera* wurden zusätzlich mit den Sequenzen der Transkripte, die auf den Gene Chip® *Vitis vinifera* gespottet sind, verglichen. Es konnten keine Übereinstimmungen gefunden werden, was bedeutet, dass diese Gene nicht auf dem Chip vorhanden waren. Bei sieben der 14 Kandidatengene konnten signifikante Unterschiede in der Genexpression festgestellt werden.

5.3 Kandidatengene für `Lockerbeerigkeit´

Aus den Ergebnissen der quantitativen Real Time PCR und der Sequenzierung der vermutlichen Promotorregionen konnten vier Kandidatengene identifiziert werden, die sowohl signifikante Genexpressionsunterschiede in den einzelnen Entwicklungsstadien zwischen kompakten und lockerbeerigen Klonen aus der Burgunderfamilie zeigten, als auch Unterschiede in der Sequenz der möglichen Promotorbereiche. Die Expressionsunterschiede waren stabil über zwei Versuchsjahre und über zwei verschiedene Standorte. Im Einzelnen handelt es sich um die Gene für ERECTA, SUPERSHOOT, SHOOT MERISTEMLESS und bZIP1. Für die beiden Kandidatengene für REVOLUTA und LATERAL SUPPRESSOR konnten zwar stabile Expressionsunterschiede gefunden werden, jedoch keine Sequenzunterschiede in den untersuchten Promotorbereichen. Im folgenden werden diese sechs Gene näher betrachtet.

5.3.1 ERECTA (ER)

Einer der am häufigsten verwendeten Arabidopsis Wildtypen ist der Ökotyp Landesberg *erecta* (*Ler*). Dieser trägt eine Mutation in der LRR – Rezeptorkinase ERECTA (ER) (Torii et al. 1996; Lease et al. 2001), die die Organform und die Infloreszenzarchitektur reguliert. ER - Mutanten haben kompaktere Infloreszenzen mit kurzen Internodien, kurze Beerenstielchen und kürzere, am distalen Ende

abgeflachte Schoten (Bowman 1993; Torii et al. 1996). Diese Phänotypen werden anscheinend durch eine veränderte Zellgröße und –anzahl verursacht (Yokoyama et al. 1998). Woodward et al. (2005) konnten in genetischen und zellulären Untersuchungen zeigen, dass ER wie Auxin die Zellteilung und Zellvergrößerung reguliert. Beide agieren weitgehend unabhängig voneinander, aber während der Ausbildung der Infloreszenzstruktur wirken beide zusammen.

Höbelbarth (2008) konnte in seiner Diplomarbeit zeigen, dass es Unterschiede im Längenwachstum der Seitenachsen und Blütenstielchen zwischen den beiden `Spätburgunder`– Klonen 18 Gm und 1–84 Gm gibt. Der Vergleich der Wachstumskurven der Stielgerüste der beiden `Spätburgunder`– Klone zeigte, dass ab BBCH 57 beim lockerbeerigen Klon 1–84 Gm ein deutlich schnelleres Wachstum als bei dem kompakten Klon in der Gescheinslänge, als auch in der Beerenstielchenlänge festgestellt werden. Ab diesem Zeitpunkt tritt eine deutliche Differenzierung zwischen dem kompakten und dem lockerbeerigen `Spätburgunder`– Klon auf. Während der Blüte wurde nur ein leichter Anstieg der Längen und somit im Wachstum festgestellt. Nach Ende der Blüte bei Stadium BBCH 69, konnte erneut ein schnelleres Wachstum der Beerenstielchenlänge im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm festgestellt werden. Zur Ernte war das gesamte Traubengerüst des lockerbeerigen Klons 1–84 Gm länger als im kompakten Klon 18 Gm.

In den Genexpressionsuntersuchungen mittels qRT PCR konnten deutliche Unterschiede in der Genexpression von ERECTA zwischen den lockerbeerigen und den kompakten Klonen der Burgunderfamilie gefunden werden. In den beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 73 erschien das Kandidatengen in allen lockerbeerigen Klonen hochreguliert, in den kompakten herunterreguliert. Diese Ergebnisse decken sich mit den Aussagen von Höbelbarth (2008), da zu diesen beiden Entwicklungszeitpunkten ein erhöhtes Wachstum im lockerbeerigen Klon zu beobachten war.

Die Sequenzen der mutmaßlichen Promotorregion für ERECTA waren homozygot. An den beiden Positionen 187 bp und 188 bp der Sequenz konnte in den lockerbeerigen Klonen eine CA Deletion festgestellt werden.

5.3.2 SUPERSHOOT (SPS)

Das SUPERSHOOT/BUSHY-(SPS/BUS) Gen kodiert für ein Cytochrom P450 – Protein (Tantikanjana et al. 2001). SPS/BUS Mutanten bilden in jeder Blattachsel

eine Vielzahl Meristeme. In SPS/BUS – Mutanten konnten erhöhte Cytokininwerte nachgewiesen werden, was auf eine Beteiligung des Phytohormons Cytokinin bei der Anlage der Meristeme hinweist (Tantikanjana et al. 2001). Reintanz et al. (2001) konnten zeigen, dass in einer SPS *Arabidopsis* Knockout Mutante das Wachstum in den Infloreszenzen nach Beginn der Blüte reduziert bzw. komplett eingestellt wurde. Zusätzlich wurden sekundäre Blütenstände, die aus den Rosetten – Blatt – Blattachsen erschienen, in der Anzahl und Länge vergrößert. Mit Beginn der Blüte stellten die sekundären Blütenstände ebenfalls ihr Wachstum ein. Das reduzierte Wachstum, zusammen mit der erhöhten sekundären Triebbildung, verursachte einen buschigen Phänotyp.

In den Genexpressionsstudien mittels qRT PCR konnten für SPS deutliche Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Klengruppen detektiert werden. Das Gen für SPS erschien sowohl vor Blüte als auch nach der Blüte in den Infloreszenzen bei den lockerbeerigen Klone hochreguliert und bei den kompakten Klonen herunterreguliert. Auch hier konnte das PCR – Fragment der möglichen Promotorregion sequenziert werden. Die Sequenz war homozygot, es konnte also nur ein Allel für diesen Bereich gefunden werden. In den Sequenzen konnten zwei SNPs detektiert werden, die eine eindeutige Unterscheidung zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen zulässt. An Position 262 bp wurde eine Transition gefunden. Hier erfolgte ein Austausch zweier Pyrimidinbasen, alle lockerbeerigen Klone besitzen ein T (262), die kompakten Klone ein C (262). Diese Art des Basenaustausches tritt relativ häufig auf, da dafür nur eine relativ einfache chemische Reaktion (Desaminierung) nötig ist. Der zweite an Position 632 bp gefundene SNP ist eine Transversion. An dieser Stelle ist die Pyrimidinbase T in den lockerbeerigen Klonen durch die Purinbase A in den kompakten Klonen substituiert.

5.3.3 SHOOT MERISTEMLESS (STM)

Das Gen SHOOT MERISTEMLESS (STM) ist entscheidend für die Inhibierung der Differenzierung des embryonalen Sprossapikalmeristems (SAM) und dessen Aufrechterhaltung in der späteren Entwicklung (Lenhard et al. 2002, Gallois et al. 2002). Es ist in allen undifferenzierten Zellen des SAMs exprimiert (Long und Barton 2000) und erfüllt seine Funktion offenbar unter anderem dadurch, dass es dort die Expression von Genen, die an der Differenzierung von lateralen Organen beteiligt sind, wie beispielsweise *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)*, unterdrückt

(Byrne et al. 2002; Byrne et al. 2000). Demgegenüber ist es in der Lage Gene, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, zu aktivieren (Gallois et al. 2002; Lenhard et al. 2002). STM kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit Homeoboxdomäne. STM bildet mit KNAT1, KNAT2 und KNAT6 die Klasse 1 unter den acht in *Arabidopsis* existierenden KNOX – Transkriptionsfaktoren (Lincoln et al. 1994; Long et al. 1996; Semiarti et al. 2001), die sich über ihre Ähnlichkeit zu dem aus Mais isolierten Gen Knotted1 definieren. Bei STM – Mutanten sind die Sprossmeristeme vergrößert, jedoch in der weiteren Entwicklung terminiert (Clark et al. 1996). Somit scheint STM zu der Aufrechterhaltung des meristematischen Schicksals beizutragen.

In den kompakten Klonen erschien STM in den Genexpressionsstudien zum Entwicklungszeitpunkt BBCH 73 deutlich herunterreguliert. Wie bei ERECTA konnte eine CA Deletion an den beiden Position 193/194 bp in den Sequenzen der kompakten Klone detektiert werden.

5.3.4 Basic Leucin Zipper 1 (bZiP 1)

Die Familie der bZiP – Transkriptionsfaktoren umfasst in Pflanzen eine große Familie unterschiedlicher Proteine. Allein im Arabidopsisgenom wurden 75 verschiedene bZiP Proteine identifiziert (Jakoby et al. 2002). Die bZiP – Proteine sind durch einen basischen Bereich (b) und eine sich daran anschließende Leucin – Zipper Domäne (ZIP) charakterisiert. Die basische Domäne vermittelt die Bindung des Proteins an spezifische DNA – *cis* – Elemente. Der Leucin – Zipper besteht aus heptameren Wiederholungen von Leucin bzw. anderen hydrophoben Aminosäuren, wie Phenylalanin, Isoleucin, Valin oder Methionin. Durch Ausbildung einer amphipatischen α – Helix ermöglicht die ZIP – Domäne die Bildung einer "coiled coil" Konformation (O'Shea et al. 1989) mit der α – Helix eines zweiten bZiP Proteins. Damit wird eine Homo– bzw. Heterodimerisierung von bZiP – Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Bei der Dimerisierung werden die basischen Domänen der Dimere so ausgerichtet, dass sie in die große Furche der DNA – Doppelhelix reichen (Vinson et al. 1989). Indem die basische Domäne nun ebenfalls eine "coiled coil" Struktur annimmt, wird die DNA – Bindung zusätzlich verstärkt (Krylov et al. 1995). Es wird angenommen, dass die Dimerisierung der bZiP – Proteine ihrer DNA – Bindung vorangeht (Landschulz et al. 1988). Metallo

und Schepartz (1997) konnten jedoch zeigen, dass einige bZIP – Proteine auch als Monomer an die DNA binden und erst danach eine Dimerisierung erfolgt.

In Pflanzen besitzen bZIP – Transkriptionsfaktoren vielfältige Funktionen, z.B. bei der lichtregulierten Genexpression (Qyama et al. 1997), bei der Pathogenabwehr (Zhou et al. 2000), bei der hormonvermittelten Genexpression (Fukazawa et al. 2000) und bei der Regulation der Expression von Speicherproteingenen im Samen (Schmidt et al. 1992).

Heinekamp (1997) konnte zeigen, dass eine erhöhte Expression von bZIP1 auch die Größe der Infloreszenzen beeinflussen kann. Durch Transformationsversuchen in Tabak konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von bZIP zu einer Verringerung der Blütengröße bzw. der Blütenstielchen führte. Da die Zellgröße nicht verringert war, ist offensichtlich die Zellteilung in diesem Gewebe reduziert.

Im Entwicklungsstadium BBCH 73 konnte eine erhöhte Genexpression von bZIP in den kompakten Klonen detektiert werden. In diesem Entwicklungsstadium konnte Höbelbarth (2008) ein reduziertes Wachstum der Blütenstielchen in den kompakten Klonen messen.

Die Sequenzen, in denen der mögliche Promotorbereich für bZIP1 liegt, waren heterozygot. Es konnten ein langes und ein kurzes Allel identifiziert werden. An Position 347 bp konnte eine Deletion im kurzen Allel der kompakten Klone festgestellt werden. An Position 998 bp des Fragments trat eine Deletion für beide Allele der kompakten Klone auf.

5.3.5 LATERAL SUPPRESSOR (LAS) und REVOLUTA (REV)

Das LATERAL SUPPRESSOR Gen wurde zuerst aus der Tomate isoliert (Schumacher *et al.* 1999). Das LATERAL SUPPRESSOR – Gen ist ein Mitglied der GRAS – Genfamilie. Die zu dieser Familie gehörenden Proteine werden als putative Transkriptionsfaktoren diskutiert (Pysh *et al.* 1999). Noch wurde für kein GRAS – Protein eine DNA – Bindung nachgewiesen. GRAS – Gene werden im Pflanzenreich für grundlegende Entwicklungsprozesse benötigt. Die Analyse verschiedener GRAS – Gene legt die Vermutung nahe, dass sie eine Funktion bei der Differenzierung von Zellen haben. In der LATERAL SUPPRESSOR – Mutante (LS) bei Tomate werden keine Lateralmeristeme in den Achseln der vegetativen Blätter angelegt. Neben dem Seitentrieb – Phänotyp weist die LS – Mutante zusätzliche Defekte in der reproduktiven Phase auf. In der Mutante werden keine

Petalen angelegt (Williams, 1960) und zudem zeigt die Pflanze eine verminderte Fertilität (Groot *et al.* 1994). In der LATERAL SUPPRESSOR – 4 – Mutante (LAS – 4) aus *Arabidopsis* ist in den Achseln von Rosettenblättern die Initiation von Lateralmeristemen unterdrückt (Greb *et al.* 2003). Dagegen werden während der reproduktiven Phase Seitentriebe in den Achseln der Stängelblätter angelegt.

Neben der zur GRAS – Familie gehörenden LAS – Mutante sind eine Reihe weiterer Mutanten bekannt, bei denen die Initiation der Lateralmeristeme gestört ist. REVOLUTA (REV) gehört zur Transkriptionsfaktorfamilie der HD – ZIP – Gene (Homeoboxdomäne Leucin Zipper Gene) . Es wird in den Leitbündeln, im SAM und in den Achselmeristemen exprimiert (Otsuga *et al.* 2001).

Die REVOLUTA – Mutante zeichnet sich neben Defekten in der Leitbündelbildung auch durch vergrößerte Blätter, Sprosse und Blütenorgane, und eine verminderte Anzahl von lateralen Meristemen in den Blattachseln aus (Talbert *et al.* 1995). Die Expression in den Blattachseln setzt kurz vor der Initiation der Meristeme ein und ist in einer LAS – 4 – Mutante in den Achseln der Rosettenblätter nicht nachweisbar. REV wirkt später als LAS bei der Initiation von Lateralmeristemen (Greb *et al.* 2003).

In beiden Genen konnten Expressionsunterschiede festgestellt werden. LAS war über beide Versuchsjahre signifikant hochreguliert in den lockerbeerigen Klonen, und signifikant herunterreguliert in den kompakten Klonen im Entwicklungsstadium BBCH 57. REV war in den beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 73 in allen lockerbeerigen Klonen hochreguliert und in allen kompakten Klonen herunterreguliert. In den Sequenzen der möglichen Promotorbereiche der Gene konnten keine Sequenzunterschiede zwischen lockerbeerigen und kompakten Klonen gefunden werden.

5.4 Schlussbetrachtung und Ausblick

Die Darstellung der Expression verschiedener Gene liefert wichtige Hinweise auf die molekularen Abläufe in der Zelle. Man kann sozusagen einen Blick in das Innenleben einer Zelle werfen, um zu verstehen, was auf molekularer Ebene geschieht. Normalerweise ist für uns nur die phänotypische Ausprägung eines Merkmals sichtbar.

Die Lockerbeerigkeit ist in doppelter Hinsicht ein sehr interessantes Merkmal bei *Vitis vinifera*. Aufgrund einer lockereren Struktur der Traube wird eine Art physikalische Resistenz gegen *Botrytis* erreicht, da keine optimalen Bedingungen

für eine Infektion durch Botrytis gegeben sind. Aufgrund des niedrigeren Infektionsrisikos kann eine verbesserte Qualität der Ernte erreicht werden, da das Lesegut bei der Ernte gesünder ist. Deutliche Unterschiede in der Traubenmorphologie sind bei der Rebsorte 'Pinot noir' zu erkennen. Es gibt eine Reihe von verschiedenen Klonen, die kompakte, lockerbeerige oder mischbeerige Traubenarchitekturen ausbilden. Die lockere Struktur einer Traube kann durch mehrere verschiedene Faktoren beeinflusst werden, wie z.B. die Beerengröße, die Beerenanzahl, den Verrieselungsgrad, die Längen der Haupt- und Verzweigungsachsen oder die Längen der Beerenstielchen (Düring et al. unveröffentlicht). Schon die Veränderung eines Faktors lässt eine lockerere oder eine kompaktere Traube entstehen. Aus diesem Grund war es für die Genexpressionsstudien wichtig, zwei Klone auszuwählen, die sich nur in einem Faktor unterscheiden und dennoch eine differentielle Traubenstruktur ausbilden.

In den beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 (vollständige Entwicklung der Infloreszenzen) und BBCH 73 (Trauben Beginnen sich abzusenken) konnten sowohl phänotypische als auch molekulare Unterschiede zwischen dem kompakten 'Spätburgunder'-Klon 18 Gm und dem lockerbeerigen 'Spätburgunder'-Klon 1-84 Gm detektiert werden.

In Versuchen an der Forschungsanstalt Geisenheim konnte gezeigt werden, dass sich die Trauben der beiden Klone nur in der Länge der Achsen und der Beerenstielchen unterschieden. Die Beerenanzahl, die Beerengröße und der Verrieselungsgrad war nahe zu identisch. Hößelbarth (2008) konnte zeigen, dass Unterschiede im Wachstum der beiden Klone zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 73 deutlich zu messen waren.

Von den insgesamt 34 mittels qRT PCR getesteten Kandidatengen konnten für 20 Kandidatengene signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Klonen zu diesen beiden Entwicklungsstadien gefunden werden. Für die sechs vorher beschriebenen Kandidatengene bZip, SPS, ER, STM, LAS und REV konnten in mindestens einem der beiden Entwicklungsstadien signifikante Unterschiede zwischen kompakt und lockerbeerig in einem erweiterten Klonensatz gefunden werden, die an den zwei Standorten Geisenheim und Heppenheim über zwei Versuchsjahre hinweg stabil waren. Der gefundene Expressionsunterschied lag im Bereich von 1,2 fach bis dreifach hoch- bzw. herunterreguliert. Die Unterschiede sind zwar nicht so groß wie z.B. bei Resistenzuntersuchungen, aber

es handelt sich hier auch nicht um eine "Alles oder Nichts" Reaktion, sondern vielmehr um feine strukturelle Unterschiede in der Ausprägung eines Merkmals.

In den Sequenzen der möglichen Promotorbereiche der Gene konnten in den vier Kandidatengenen ER, SPS, STM und bZIP1 Sequenzunterschiede gefunden werden, die eindeutig im erweiterten Probensatz von Klonen aus der Burgunderfamilie zwischen kompakt und lockerbeerig differenzieren. Diese SNPs konnten in einem Probensatz von 22 verschiedenen Rebsorten, der auf Grund der differentiellen Ausprägung der Traubenarchitektur zusammengestellt wurde, nicht als differenzierend bestätigt werden. Es ist also davon auszugehen, dass die gefundenen Unterschiede zwar innerhalb der Sorten 'Spätburgunder', 'Grauburgunder' und 'Chardonnay' zwischen kompakt und lockerbeerig differenzieren, nicht aber in anderen Rebsorten. Mit neueren Technologien, wie dem „Next Generation Sequencing“ wird es möglich sein, alle 68 'Spätburgunder'-Klone effektiv auf die gefundenen Sequenzunterschiede im Hochdurchsatz zu untersuchen, und damit ihre Funktionalität bzw. die Korrelation im Bezug auf die Ausprägung der Lockerbeerigkeit zu überprüfen.

Mit den durchgeführten Experimenten konnten erste molekulare Erkenntnisse zur Lockerbeerigkeit gewonnen werden. Es wurde deutlich, dass die Ausprägung des Merkmals durch mehrere Gene beeinflusst wird. Die in dieser Arbeit identifizierten Kandidatengene bZIP1, ERECTA, SUPERSHOOT und SHOOT MERISTEMLESS könnten interessante Marker für das Merkmal Lockerbeerigkeit sein. Aufgrund der Sequenzunterschiede konnten molekulare Marker entwickelt werden, die nach Prüfung auf Funktionalität, für die Klonenselektion oder für die Rebenzüchtung eingesetzt werden könnten. Dadurch könnten noch vor der Traubenbildung gezielt lockerbeerige Klone identifiziert werden. Mit dem neu erlangten Wissen und den Ergebnissen aus diesem Projekt sollte es möglich sein, spezifische Marker für verschiedene Merkmale zu entwickeln, um Klone innerhalb einer Sorte unterscheiden zu können und somit eine sinnvolle Selektion von genetischen Ressourcen zu erlauben. Dadurch wäre die Erhaltung der genetischen Diversität innerhalb einer Sorte gewährleistet.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Experimente zur Identifizierung von Kandidatengen, die an der differentiellen Ausprägung der Traubenstruktur beteiligt sein könnten, durchgeführt. Die Untersuchungen konzentrierten sich zunächst auf Genexpressionsstudien mittels Microarray Hybridisierungen und quantitativer Real Time PCR an den beiden 'Spätburgunder'-Klonen 18 Gm, der eine kompakte Traubenstruktur ausbildet, und 1-84 Gm, der eine lockere Traubenstruktur ausbildet. In weiteren Untersuchungen wurden die Ergebnisse für die beiden Klone an einem größeren Probensatz diverser Klone der Burgunderfamilie verifiziert. Abschließend wurden die möglichen Promotorbereiche der interessantesten Kandidatengene sequenziert und auf mögliche Polymorphismen untersucht. Anhand der gefundenen Unterschiede in der Sequenz wurden molekulare Marker entwickelt.

Qualitativ hochwertige RNA aus der Weinrebe zu extrahieren ist schwierig, da die Rebe sehr reich an Phenolen und Polysacchariden ist. Es konnte eine RNA Extraktionsmethode etabliert werden, die es erlaubte, relativ schnell qualitativ hochwertige RNA aus den verschiedensten Geweben der Weinrebe unter Freilandbedingungen zu extrahieren.

Im Vergleich der beiden 'Spätburgunder'-Klone 18 Gm und 1-84 Gm mittels Microarray Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass ein gewisses Maß an genetischer Diversität innerhalb einer Sorte vorhanden ist. Es konnten 5000 Gene identifiziert werden, die zu drei verschiedenen Entwicklungszeitpunkten differentiell exprimiert waren. Die Ergebnisse konnten anhand ausgewählter Kandidatengene mittels qRT PCR bestätigt werden.

Es wurden ausführliche molekulare Untersuchungen an zehn Klone des 'Blauen Spätburgunders', 'Chardonnay' und 'Grauburgunder' durchgeführt. Es konnten die vier Kandidatengene bZIP, SUPERSHOOT, ERECTA und SHOOT MERISTEMLESS gefunden werden, die signifikant differenziell exprimiert sind zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klone.

In den möglichen Promotorsequenzen dieser vier Gene konnten eindeutige Sequenzunterschiede zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen aus der Burgunderfamilie gefunden werden. Anhand dieser wurden molekulare Marker entwickelt, die momentan auf ihre Funktionalität hin überprüft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erste Erkenntnisse zur Lockerbeerigkeit gewonnen werden. Mit dem neu erlangten Wissen und den Ergebnissen aus diesem Projekt sollte es möglich sein, spezifische Marker für verschiedene Merkmale zu entwickeln, um Klone innerhalb einer Sorte unterscheiden zu können und somit eine sinnvolle Selektion von genetischen Ressourcen für die Züchtung zu erlauben.

7 Summary

In this projects experiments were carried out to identify candidate genes which could be involved in the differential shape of the grapevine clusters. The investigations concentrated first on genetic expression studies by the use of microarray hybridizations and quantitative real time PCR in the both *Pinot noir* clones 18 Gm (compact cluster) and 1-84 Gm (loose cluster). In further investigations the results of the two *Pinot noir* clones were verified in a larger set of various clones of the *Pinot* family. Finally the supposed promoter regions of the most interesting candidate genes were sequenced, to find possible polymorphisms in the sequence between compact and loose clones. On the basis of the polymorphisms molecular markers for the breeding were developed.

To extract high-quality RNA from *Vitis vinifera* is difficult, because grapes are very richly in phenols and polysaccharides. An extraction method RNA could be established, which allows to extract relatively quickly high-quality RNA from the most different tissues of the grapes under field conditions.

The results of the microarray hybridizations for the both *Pinot noir* clones 18 Gm and 1-84 Gm shown clearly that clonal genetic variation within grape cultivars exists. The results could be confirmed with quantitative real time PCR.

Detailed molecular investigations were performed in ten clones of *Pinot noir*, *Pinot gris* and Chardonnay. Four candidate genes bZIP, SUPERSHOOT, ERECTA and SHOOT MERISTEMLESS shown significantly differential expression between the compact clones and the loose clones.

In the supposed promoter regions of these four genes sequence differences could be found between the compact clones and the loose clones from the *Pinot* family. With the help of this the molecular markers were developed. At the moment their are tested on functionality.

Within the scope of this project the first knowledge could be won to the trait differential shape of the grapevine clusters. The attained knowledge and the results from this project should enable to develop specific markers for different

traits to be able to distinguish clones within a kind. With these markers a suggestive selection of genetic resources should be possible for the grape breeding.

8 Literaturverzeichnis

- Achleitner D (2008)** Untersuchungen zur lateralen Infektion von Weintrauben durch *Botrytis cinerea*. Dissertation, Boku Wien
- Alleweldt G, Engel M, Gebbing H (1981)** Histologische Untersuchungen an der Weinrebe. *Vitis* **20**: 1-7
- Altman DG, Bland JM (1983)** Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. *Statistician* **32**: 307-317
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977)** Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5350-5354
- Aradhya MK, Dangl GS, Prins BH, Boursiquot JM, Walker MA, Meredith CP, Simon C (2003)** Genetic structure and differentiation in cultivated grape *Vitis vinifera*. *Genetical Research* **81** (3): 179-192
- Baillo d M, Baggio lini M (1993)** Les stades reperes de la vinge. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* **28**: 7-9
- Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (2001)** Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen – BBCH Monografie. 2. Auflage. www.bba.bund.de
- Black DL (2003)** Mechanisms of alternative pre – messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **72** (1): 291-336
- Blaich R, Stein U, Wind R (1984)** Perforationen in der Cuticula von Weinbeeren als morphologischer Faktor der Botrytisresistenz. *Vitis* **23**: 242-256
- Bland JM, Altman DG (1986)** Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* **1** : 307-310
- Boss PK & Thomas M (2003)** Association of dwarfism and floral induction with a grape `green revolution´ mutation. *Nature* **416** (6883): 847-850
- Bowman JL (1993)** *Arabidopsis: an Atlas of Morphology and Development*. New York: Springer Verlag
- Bustin SA & Nolan T (2004a)** Chemistries. In : Bustin SA: A – Z of Quantitative PCR. International University Line. Book chapter **6**: 217-278
- Bustin SA & Nolan T (2004b)** Data analysis and Interpretation. In : Bustin SA: A – Z of Quantitative PCR. International University Line. Book chapter **11**: 439-492

- Bustin SA (2000)** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**: 169-193
- Bustin SA (2002)** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29** (1): 23-39
- Byrne ME, Barley R, Curtis M., Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, Martienssen RA (2000)** ASYMMETRIC LEAVES 1 mediates leaf patterning and cell stem function in *Arabidopsis*. *Nature* **408** (6815): 967-971
- Byrne ME, Simorowski J, Martienssen RA (2002)** ASYMMETRIC LEAVES 1 reveals KNOX gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development* **29**: 1957-1965
- Chang S, Puryear J, Cairney J (1993)** A simple method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**: 113-116
- Chuaqui RF, Bronner RF, Best CJ, Gillespie JW, Faig MJ, Hewitt SM, Phillips JL, Krizman DB, Tangrea MA, Ahram M, Lineham WM, Knezevic V, Ermert-Buck MR (2002)** Post analysis follow up and validation of microarray experiments. *Nature Genetics* **32**: 509-514
- Clark SE, Jacobsen SE, Levin JZ, Meyerowitz EM (1996)** The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate Meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122**: 1567-1575
- Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, Golub TR (2000)** Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (7): 3260-3265
- Dai Y, Wang HZ, Li BH, Huang j, Liu XF, Zhou YH, Mou ZL, Li JY (2006)** Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar Auxin transport and leads to plant architectural abnormality in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 308-320
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991)** "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* **19** (14): 4008
- Eichhorn KW, Lorenz DH (1977)** Phänologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **29**: 119-120

- Fukazawa J, Sakai T, Ishida S, Yamaguchi I, Kamiya Y, Takahashi Y (2000)** Repression shoot growth, a bZiP transcription activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell* **12**: 901-915
- Gallois J, Woodward C, Reddy GV, Sablowski R (2002)** Combined SHOOT MERISTEMLESS an WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development* **129**: 3207-3217
- Gärtel W (1970)** Über die Eigenschaften von *Botrytis cinerea* als reparasit unter besonderer Berücksichtigung von Infektion und Inkubation. *Weinberg und Keller* **17**: 15-52
- Ginzinger DG (2002)** Gene quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT – PCR): Trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**: 23-39
- Goosey L, Sharrock R (2001)** The *Arabidopsis* compact inflorescence genes: phase – specific growth regulation and determination of inflorescence architecture. *The Plant Journal* **26** (5): 549-559
- Greb T, Clarenz O, Schäfer E, Müller D, Herrero R, Schmitz G, Theres K (2003)** Molecular Analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes & Development* **17**: 1175-1187
- Green B, Zinovia T, Tovey E (2003)** Allergen detection from 11 fungal species before and after germination. *J. of All. And Clin. Imm.* **111** (2): 285-289
- Groot SPC, Keizer LCP, De Ruiter W, Dons JJM (1994)** Seed and fruit set of the lateral suppressor mutant of tomato. *Sci. Horti.* **59**: 157-162
- Halgren RG, Fielden MR, Fong CJ, Zacharewski TR (2001)** Assessment of clone identity and sequence fidelity for 1189 IMAGE cDNA clones. *Nucleic Acids Res.* **29** (2): 582-588
- Heinekamp T (1997)** Funktionelle Analyse des pflanzlichen bZiP – Transkriptionsfaktors G/HBF – 1. Diplomarbeit, Universität Bielefeld
- Higuchi R, Dollinger P, Walsh PS, Griffith R (1992)** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* **10** (4): 413-417
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993)** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **11**: 1026-1030
- Hod Y (1992)** A simplified ribonuclease protection assay. *Biotechniques* **163**: 852-854

- Höbelbarth F (2008)** Ausmaß klonaler Variation bei ausgewählten Klonen der Sorte Blauer Spätburgunder und Chardonnay. Diplomarbeit Fachhochschule Wiesbaden
- Iandolino AB, Goes da Silva F, Lim H, Choi H, Williams LE, Cook DR (2004)** High – Quality RNA , cDNA, and derived EST Libraries from Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology Reporter* **22**: 269-278
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Hugueney P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pè ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quétier F, Wincker P; French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization (2007)** The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**, 463-467
- Jakoby M, Weisshaar B, Droege – Laser W, Vincente – Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F (2002)** BZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **7**: 106-111
- Jenson SD, Robetroye RS, Bohling SD, Schumacher JA, Morgan JW, Lim MS, Elenitoba-Johnson KSJ (2003)** Validation of cDNA microarray gene expression data obtained from linearly amplified RNA. *Mol. Pathol.* **56** (6): 307-312
- John HA, Birstiel ML, Jones KW (1969)** RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* **223** (206): 582-587
- Jörger V (2005)** Resistenzzüchtung gegen Botrytis. *Der badische Winzer.* **7**: 29-32
- Kafatos FC, Jones CW, Efstratiadis A (1979)** Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentration by dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res.* **7** (6): 1541-1552
- Kast W, Schiefer HC (2005)** Botrytis – Biologie des Erregers und Konsequenzen für die Behandlung. LVWO Weinsberg. Fachinformationen. www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de

- Koizumi S (2004)** Application of DNA Microarrays in Occupational Health Research. *J. Occup. Health* **46**: 20-23
- Kosuge T & Hewitt B (1964)** Exudates of grape berries and their effect on germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **54**: 167-172
- Kreucher G (2003)** Der Kaiser Marcus Aurelius und seine Zeit. Steiner Verlag, Stuttgart. [ISBN 3-515-08382-0](#) (Historia Einzelschriften 174)
- Krylow D, Olive M, Vinson C (1995)** Extending dimerization interfaces: the bZIP basic region can form a coiled coil. *EMBO J.* **14**: 5329-5337
- Landschul WH, Johnson PF, McKnight SL (1988)** The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764
- Lease KA, Wen J, Li J, Doke JT, Liscum E, Walker JC (2001)** A mutant Arabidopsis heterotrimeric G protein beta subunit affects leaf, flower and fruit development. *Plant Cell* **13** (12): 2631-2641
- Lenard M, Jürgens G, Laux T (2002)** The WUSCHEL and SHOOT MERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot Meristem regulation. *Development* **29**: 3195-3206
- Li X, Qian Q, Fu Z, Wang Y, Xiong G, Zeng D, Wang X, Liu X, Teng S, Hiroshi F (2003)** Control of tillering in rice. *Nature* **422**: 618-621
- Lincoln C, Long J, Yamaguchi J, Serikawa H, Hake S (1994)** A knotted 1 – like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* **6** (12): 1859-1876
- Lipschutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ (1999)** High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics* **21**: 20-24
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**: 402-408
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettis MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kabayashi M, Horton H Brown EL (1996)** Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology* **14**: 1675-1680
- Long J, Barton MK (2000)** Initiation of auxiliary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Developmental Biology* **218**: 341-353

- Long JA, Moan EL, Medford JI, Barton MK (1996)** A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of *Arabidopsis*. *Nature*. **379** (6560): 66-69
- Lorenz DH, Eichhorn KW, Bleiholder H, Klose R, Meier U, Weber E (1994)** Phänologische Entwicklungsstadien der Weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *Vinifera*). Codierung und Beschreibung nach der erweiterten BBCH – Skala. *Wein Wissenschaft* **49** (2): 66-70
- Metallo SJ, Schepartz A (1997)** Certain bZip peptides bind DNA sequentially as monomers and dimerize on the DNA. *Nat. Struc. Biol.* **4**: 115-117
- Mills JC, Gordon JL (2001)** A new approach for filtering noise from high – density oligonucleotide microarray datasets. *Nucleic Acids Res.* **29**(15): E72 – 2
- Mitra RD & Church GM (1999)** In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules. *Nucleic Acids Res.* **24** (24): e34
- Mutch DM, Berger A, Mansourian R, Rytz A, Roberts MA (2002)** The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data. *BMC Bioinformatics* **3**: 17
- Nikiforov TT & Rogers YH (1995)** The use of 96-well polystyrene plates for DNA hybridization-based arrays: an evaluation of different approaches to oligonucleotide immobilization. *Anal. Biochem.* **227** (1): 201-209
- Nordström A, Tarkowski O, Tarkowska D, Norbaek R, Astot C, Dolezal K, Snadberg G (2004)** Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for Auxin – cytokinin – regulated development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 8039-8044
- O`Shea EK, Rutkowski R, Kim PS (1989)** Evidence that leucine zipper is a coiled coil. *Science* **243**: 538-542
- Otsuga D, DeGuzmann B, Prigge MJ, Drews GN, Clark SE (2001)** REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant Journal* **25**: 223-236
- Palni LMS, Burch L, Horgan R (1988)** The effect of Auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. *Planta* **194**: 439-442
- Pardue ML, Gall J (1969)** Formation and detection of RNA – DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **63** (2): 378-383

- Parker RM, Barnes NM (1999)** Detection by in situ and northern hybridization. *Methods in Molecular Biology* **106**: 247-283
- Pfaffl MW (2001)** A new mathematical model for relative quantification in Real-Time RT – RCR. *Nucleic Acids Res.* **29** (9): 2002-2007
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002)** Relative expression software tool (REST ©) for group – wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real – time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30** (9): e36
- Phillips R (2003)** Die große Geschichte des Weins. Campus, Frankfurt und New York, ISBN 3-593-37390-4
- Porten M (2001)** Die Spätburgunderklone – Klontypen. DLR. Neustadt. Fachinformationen. www.dlr.rlp.de
- Porten M (2004)** Die Wahl des richtigen Spätburgunderklons. DLR. Neustadt. Fachinformationen. www.dlr.rlp.de
- Pysh LD, Wysocka – Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN (1999)** The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW – LIKE genes. *Plant Journal* **18**: 111-119
- Quakenbush J (2002)** Microarray data normalisation and transformation. *Nature Genetics* **32**: 496-501
- Qyama T, Shimura Y, Okada K (1997)** The Arabidopsis HY5 gene encodes a bziP protein That regulates stimulus – induced development of root and hypocotyls. *Genes Developmant* **11**: 2983-2995
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A (2004)** A Guidline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**: 856-862
- Rajeevann MS, Ranamukkaarchchi DG, Vernon SD, Unger ER (2001)** Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* **25**: 443-451
- Rajeevann MS, Verono SD, Taysavang N, Unger ER (2001)** Validation of Array-Based Gene Expression Profiles by Real-Time (Kinetic) RT-PCR. *JMD.* **3**: 26-31
- Ramakers C, Ruijter JM, Lekanne Deprez RH, Moorman AFM (2003)** Assumption – free analysis of quantitative real – time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **339**: 62-65

- Rappolee Da, Mark D, Banda MJ, Werb Z (1998)** Wound macrophage express TGF – alpha and other growth factors in vivo analysis by mRNA phenotyping. *Science* **241**: 708-712
- Regner F, Stadlbauer A, Eisenheld C, Kaserer H (2000)** Genetic relationships among Pinots and related cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* **51** (1) 7-14
- Reintanz B, Lehnen M, Reichelt M, Gershenzon J, Kowalczyk M, Sandberg G, Godde M, Uhl R, Palme K (2001)** BUS, a bushy Arabidopsis CYP79F1 Knockout Mutant with Abolished Synthesis of Short – Chain Aliphatic Glucosinolates. *Plant Cell* **13** (2): 351-367
- Reis H, Pfiffi S, Hahn M (2005)** Molecular and functional characterization of a secreted lipase from botrytis cinerea. *Mol. Plant Pathol.* **6** (3): 257-267
- Reue K (1998)** mRNA Quantification Techniques: Considerations for experimental design and application. *The Journal of Nutrition* **128** (11): 2038-2044
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997)** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245** (2): 154-160
- Saccomanno CF, Bordonaro M, Chen JS, Nordstrom JL (1992)** A faster ribonuclease protection assay. *Biotechniques* **13**: 846-850
- Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Ehrlich HA (1989)** Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6230-6234
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manuel.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Sawicki MP, Samara G, Hurwitz M, Passaro E (1993)** Human Genome Project. *Am. J. Surg.* **165** (2): 268-264
- Schena M, Schalton D, Davis RW, Brown PO (1995)** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467-470
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW (1996)** Parallel human genome analysis: microarray based expression monitoring of 100 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 10614-10619
- Schmidt RJ, Ketudat M, Aukerman MJ, Hoschek G (1992)** Opaque – 2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22 – kD zein genes. *Plant Cell* **2**: 689-700

- Schmitz G, Tillmann E, Carriero F, Fiore C, Cellini F, Theres K (2002)** The tomato BLIND gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation on lateral meristems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2**: 1064-1069
- Schuhmacher K, Schmitt T, Rossberg M, Schmitz G, Theres K (1999)** The LATERAL SUPPRESSOR (LS) gene of tomato encodes a new member of the VHIID family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 290-295
- Semiarti E, Ueno Y, Tsukaya H, Iwakawa H, Machida C, Machida Y (2001)** The ASYMMETRIC LEAVES 2 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina establishment of venation and repression of meristem – related homeobox genes in leaves. *Development* **28**: 1771-1783
- Sievers R (2007)** Wein in Burgund. Exkursion in Burgund.
- Smith H, Hake S (2003)** The interaction of Two Homeobox Genes, BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE, Regulates Internode Patterning in the *Arabidopsis* Inflorescence. *Plant Cell* **15**: 1717-1727
- Southern EM (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517
- Stirnberg P, Chatfield SP, Leyser HM (1999)** AXR1 acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **121**: 839-847
- Stirnberg P, van De Sande K, Leyser HM (2002)** MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* **129**: 1131-1141
- Talbert PB, Adler HT, Paris DW, Comai L (1995)** The REVOLUTA gene is necessary for apical meristem development and for cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121** (9): 2723-2735
- Tantikanjana T, Young JW, Letham DS, Griffith M, Hussein M, Ljung K, Snadberg G, Sundaresan V (2001)** Control of auxiliary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the SUPERSHOOT gene. *Genes & Development* **15**: 1577-1588
- Torii, KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier RF, Komeda Y (1996)** The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine rich repeats. *Plant Cell.* **8**: 735-746
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Pappé B, VanRoy N, De Paepe A, Speleman F (2002)** Accurate normalization of real time quantitative RT –

PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3** (7): 1-11

- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, FitzGerald LM, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, Macalma T, Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, Gatto P, Oyzerski R, Moretto M, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, Segala C, Davenport C, Demattè L, Mraz A, Battilana J, Stormo K, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, Perbost C, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett JA, Sterck L, Vandepoele K, Grando SM, Toppo S, Moser C, Lanchbury J, Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar SK, Fontana P, Gutin A, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R (2007)** A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. *PloS One.* **2** (12): e1326
- Venglat T, Dumonceaux T, Rozwadowski K, Parnell L, Babic V, Keller W, Martinssen R, Selvaraj G, Dalta R (2002)** The homeobox gene *BREVIPEDICELLUS* is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *PNAS.* **99** (7): 4730-4735
- Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL (1989)** Scissors – grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science.* **246**: 911-916
- Wall SJ, Edwards DR (2002)** Quantification reverse transcription polymerase chain reaction (RT – PCR): a comparison of primerdropping competitive, and real – time RT – PCRs. *Analytical Biochem.* **300**: 269-273
- Wang T, Brown MJ (1999)** m RNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with Rnase protection. *Analytical Biochem.* **269**: 198-201
- Wang Y, Li J (2006)** Genes controlling plant architecture. *Cur. Opi. Biotech.* **17**: 1-7
- Watson B (1993)** Evaluation of Winegrape Maturity. *Oregon Viticulture* **30**: 235-245
- Wilcox JN (1993)** Fundamental principles of in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* **41**: 1725-1733
- Williams W (1960)** The effect of selection on the manifold expression of the suppressed lateral gene in the tomato. *Her.* **14**: 285-296

- Wilson IG, (1997)** Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 3741-3751
- Wong ML, Medrano JF (2005)** Real-time PCR for RNA quantitation. Biotechniques **39**: 75-85
- Woodward C, Bemis S, Hill EJ, Sawa S, Kosihba T, Torii K (2005)** Interaction of Auxin and ERECTA in Elaborating Arabidopsis Inflorescences Architecture revealed by the Activation Tagging of a New Member of the YUCCA Family Putative Flavin Monooxygenases. Plant Physiol. **23**: 1-12
- Wright PS, Cross – Doersen D, Chmielewski PA, Bush TL, Bionti AJ, Miller JA (1995)** Measurement of mRNA levels with quantitative audiography and in situ hybridization. Faseb. J. **9**: 279-283
- Yokoyama R, Takahashi T, Kato A, Torii KU, Komeda Y (1998)** The *Arabidopsis* ERECTA gene is expressed in the shoot apical meristem and organ primordial. Plant Journal **15** (3): 301-310
- Zeng, Y. and Yang, T. (2002)** RNA Isolation From Highly Viscous Samples Rich in Polyphenols and Polysaccharides Plant Molecular Biology Reporter 20: 417a-417e
- Zhang J, Byrne CD (1997)** Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly competitive reverse transcriptase PCR. Biochem. J. **337**: 231-241
- Zhou JM, Trifa Y, Silva H, Pontier D, Lam E, Shah J, Klessig DF (2000)** NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. Mol. Plant Microbe Int. **13**: 191-202

9 Anhang

9.1 Sequenzen für das Kandidatengen SUPERSHOOT

	1	100
Harslevelue	(1)	-----CAAGAAATAACCAACAACACTAGG TAGCATTTC CAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
Arbane	(1)	ATTCACCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG TAGCATTTC CAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
Räuschling	(1)	----- ATCAGTTTCATGG
Black Rose	(1)	----- GG
1-84 Gm Gm	(1)	ATTCACCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG TAGCATTTC CAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
1-84 Gm Hm	(1)	ATTCACCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG TAGCATTTC CAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
M242 Hm	(1)	ATTCACCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG TAGCATTTC CAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
1-30 Gm Gm	(1)	----- GG TAGCATTTC CAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
1-45 Gm Gm	(1)	----- TTCAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
Müller-Thurgau	(1)	-----CCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG TAGCATTTC CAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
Muskateller	(1)	---CACCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG TAGCATTTC CAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
Riesling	(1)	-----CAACACTAGG TAGCATTTC CAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
Dunkelfelder	(1)	-----TCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG TAGCATTTC CAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
Traminer rot	(1)	----- TAGCATTTC CAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
Silvaner	(1)	ATTCACCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG TAGCATTTC CAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
Grauburgunder	(1)	----- TAGCATTTC CAAA TTCACTTC CAGCAC TTGGAATGAGCAGT GGCTTTAT TCAGTTTCATGG
Schwarzriesling	(1)	----- TTGCTTTATCAGTTTCATGG
Dakapo	(1)	-----
St. Laurent	(1)	-----
18 Gm Gm	(1)	-----
18 Gm Hm	(1)	-----
Inra 777 Gm	(1)	-----
54 Gm Gm	(1)	-----
	101	200
Harslevelue	(85)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
Arbane	(101)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
Räuschling	(15)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
Black Rose	(4)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
1-84 Gm Gm	(101)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
1-84 Gm Hm	(101)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
M242 Hm	(101)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
1-30 Gm Gm	(63)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
1-45 Gm Gm	(54)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
Müller-Thurgau	(89)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
Muskateller	(98)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
Riesling	(71)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
Dunkelfelder	(90)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
Traminer rot	(60)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
Silvaner	(101)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
Grauburgunder	(61)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
Schwarzriesling	(23)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
Dakapo	(1)	----- ATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
St. Laurent	(1)	----- ATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
18 Gm Gm	(1)	----- TTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
18 Gm Hm	(1)	----- ATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
Inra 777 Gm	(1)	--- GGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
54 Gm Gm	(1)	----- ATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA CAACACTTTACCTGGAAAGC GGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCACTTTTC
	201	300
Harslevelue	(185)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Arbane	(201)	TGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Räuschling	(115)	TGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Black Rose	(104)	TGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
1-84 Gm Gm	(201)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
1-84 Gm Hm	(201)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
M242 Hm	(201)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
1-30 Gm Gm	(163)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
1-45 Gm Gm	(154)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Müller-Thurgau	(189)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Muskateller	(198)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Riesling	(171)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Dunkelfelder	(190)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Traminer rot	(160)	TGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Silvaner	(201)	TGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Grauburgunder	(161)	TGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Schwarzriesling	(123)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Dakapo	(96)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
St. Laurent	(96)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
18 Gm Gm	(82)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
18 Gm Hm	(94)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Inra 777 Gm	(98)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
54 Gm Gm	(96)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCATAGATCCATCTCTG GAGAAAACACCAGTTG AAAAATATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA

	701	800
Harslevelue (685)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
Arbane (701)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
Räuschling (615)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
Black Rose (604)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
1-84 Gm Gm (701)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
1-84 Gm Hm (701)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
M242 Hm (701)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
1-30 Gm Gm (663)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
1-45 Gm Gm (654)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
Müller-Thurgau (689)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
Muskateller (698)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
Riesling (671)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
Dunkelfelder (690)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
Traminer rot (660)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
Silvaner (701)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
Grauburgunder (661)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
Schwarzriesling (623)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
Dakapo (586)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
St. Laurent (596)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
18 Gm Gm (582)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
18 Gm Hm (461)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
Inra 777 Gm (598)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT
54 Gm Gm (579)	SAGAGAGTACAGT	GATGGGTATGAACAAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAATAAGAAATTAAGCATGCATGGT

	801	900
Harslevelue (785)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
Arbane (801)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
Räuschling (715)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
Black Rose (704)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
1-84 Gm Gm (801)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
1-84 Gm Hm (801)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
M242 Hm (801)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
1-30 Gm Gm (763)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
1-45 Gm Gm (754)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
Müller-Thurgau (789)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
Muskateller (798)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
Riesling (771)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
Dunkelfelder (790)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
Traminer rot (760)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
Silvaner (801)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
Grauburgunder (761)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
Schwarzriesling (723)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
Dakapo (586)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
St. Laurent (696)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
18 Gm Gm (681)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
18 Gm Hm (461)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
Inra 777 Gm (698)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---
54 Gm Gm (579)	SAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAA	---

	901	974
Harslevelue (882)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
Arbane (901)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
Räuschling (815)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
Black Rose (801)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
1-84 Gm Gm (901)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
1-84 Gm Hm (901)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
M242 Hm (901)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
1-30 Gm Gm (860)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
1-45 Gm Gm (854)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
Müller-Thurgau (889)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
Muskateller (898)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
Riesling (871)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
Dunkelfelder (887)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
Traminer rot (856)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
Silvaner (901)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
Grauburgunder (860)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
Schwarzriesling (823)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
Dakapo (586)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
St. Laurent (702)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
18 Gm Gm (681)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
18 Gm Hm (461)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
Inra 777 Gm (752)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----
54 Gm Gm (579)	AGGTTTAAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCCTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATTTCCTCA	-----

9.2 Sequenzen für das Kandidatengen SHOOT MERISTEMLESS

	1	100
Harslevelue	(1)	-----CACTGTTAGTTC
Arbane	(1)	-----TC
Koshu	(1)	-----
Räuschling	(1)	-----
Black Rose	(1)	-----
Cardinal	(1)	-----TC
1-84 Gm Gm	(1)	-----TC
1-84 Gm Hm	(1)	-----TC
M242 Hm	(1)	-----TC
1-30 Gm Gm	(1)	-----TTAGTTC
1-45 Gm Gm	(1)	-----TC
Regent	(1)	-----TC
Dornfelder	(1)	-----TC
Kerner	(1)	-----TTAGTTC
Müller-Thurgau	(1)	-----
Muskateller	(1)	-----ACGCCACTGTTCTCTCACTGTTAGTTC
Riesling	(1)	-----TTAGTTC
Dunkelfelder	(1)	-----TC
Traminer rot	(1)	-----TC
Silvaner	(1)	-----TC
Felicia	(1)	-----
Grauburgunder	(1)	-----
Schwarzriesling	(1)	-----
Dakapo	(1)	-----GTCCCGTATGACCCCTGCTTACCTAAAAGCCTAATCTCCGCTTACACGCCACTGTTCTCTCACTGTTAGTTC
St. Laurent	(1)	-----
Villaris	(1)	-----TC
18 Gm Gm	(1)	-----
18 Gm Hm	(1)	-----TC
INRA 777 Gm	(1)	-----
INRA 777 Hm	(1)	-----
54 Gm Gm	(1)	-----
	101	200
Harslevelue	(13)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Arbane	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Koshu	(1)	-----TGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Räuschling	(1)	-----ACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Black Rose	(1)	-----ACTCTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Cardinal	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
1-84 Gm Gm	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
1-84 Gm Hm	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
M242 Hm	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
1-30 Gm Gm	(8)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
1-45 Gm Gm	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Regent	(38)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Dornfelder	(4)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Kerner	(8)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Müller-Thurgau	(1)	-----CTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Muskateller	(29)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Riesling	(8)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Dunkelfelder	(4)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Traminer rot	(38)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Silvaner	(4)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Felicia	(1)	-----CATCTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Grauburgunder	(1)	-----CTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Schwarzriesling	(1)	-----CTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Dakapo	(74)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
St. Laurent	(1)	-----TGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
Villaris	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
18 Gm Gm	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
18 Gm Hm	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
INRA 777 Gm	(1)	-----CATCTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
INRA 777 Hm	(1)	-----CATCTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
54 Gm Gm	(1)	-----TGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCGCCCTTTGTAAAGCTTTGTAGTGTAGTGTACCTGTACCGCCATCTCTTTTAAACACACACACACACAAAGGA
	201	300
Harslevelue	(113)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Arbane	(103)	CWSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Koshu	(93)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Räuschling	(100)	CWSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Black Rose	(97)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Cardinal	(103)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
1-84 Gm Gm	(103)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
1-84 Gm Hm	(103)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
M242 Hm	(103)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
1-30 Gm Gm	(108)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
1-45 Gm Gm	(103)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Regent	(138)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Dornfelder	(104)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Kerner	(108)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Müller-Thurgau	(96)	CWSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Muskateller	(129)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Riesling	(108)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Dunkelfelder	(102)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Traminer rot	(138)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Silvaner	(104)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Felicia	(98)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Grauburgunder	(93)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Schwarzriesling	(94)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Dakapo	(174)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
St. Laurent	(93)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Villaris	(101)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
18 Gm Gm	(101)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
18 Gm Hm	(101)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
INRA 777 Gm	(96)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
INRA 777 Hm	(96)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
54 Gm Gm	(91)	CTSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG

		601	700
Harslevelue	(513)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Arbane	(503)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Koshu	(493)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Räuschling	(500)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Black Rose	(497)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Cardinal	(503)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
1-84 Gm Gm	(503)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
1-84 Gm Hm	(503)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
M242 Hm	(503)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
1-30 Gm Gm	(508)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
1-45 Gm Gm	(503)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Regent	(538)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Dornfelder	(504)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Kerner	(508)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Müller-Thurgau	(496)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Muskateller	(529)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Riesling	(508)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Dunkelfelder	(502)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Traminer rot	(538)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Silvaner	(504)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Felicia	(498)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Grauburgunder	(493)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Schwarzriesling	(494)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Dakapo	(574)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
St. Laurent	(493)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
Villarlis	(501)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
18 Gm Gm	(501)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
18 Gm Hm	(501)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
INRA 777 Gm	(496)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
INRA 777 Hm	(496)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG
54 Gm Gm	(491)	GTGTTTCATATGTTTCAACTACCC	TAATACACATTATTTTAGCTAATG

		701	800
Harslevelue	(613)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Arbane	(603)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Koshu	(593)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Räuschling	(600)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Black Rose	(597)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Cardinal	(603)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
1-84 Gm Gm	(603)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
1-84 Gm Hm	(603)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
M242 Hm	(603)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
1-30 Gm Gm	(608)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
1-45 Gm Gm	(603)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Regent	(638)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Dornfelder	(604)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Kerner	(608)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Müller-Thurgau	(596)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Muskateller	(629)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Riesling	(608)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Dunkelfelder	(602)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Traminer rot	(638)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Silvaner	(604)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Felicia	(598)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Grauburgunder	(593)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Schwarzriesling	(594)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Dakapo	(674)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
St. Laurent	(593)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
Villarlis	(601)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
18 Gm Gm	(601)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
18 Gm Hm	(601)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
INRA 777 Gm	(596)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
INRA 777 Hm	(596)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG
54 Gm Gm	(591)	CCTCAITTAATAGCCCTAGTGTG	TGACATTCTTTTATTTCTCCTAATG

		801	854
Harslevelue	(713)	TTTCGGGCTTTG	-----
Arbane	(703)	TTTCGGGCTTTG	GA-----
Koshu	(693)	TTTCGGGCTTTG	-----
Räuschling	(700)	TTTCGGGCTTTG	-----
Black Rose	(697)	TTTCGGGCTTTG	-----
Cardinal	(703)	TTTCGGGCTTTG	-----
1-84 Gm Gm	(703)	TTTCGGGCTTTG	GA-----
1-84 Gm Hm	(703)	TTTCGGGCTTTG	GA-----
M242 Hm	(686)	TTTCGGGCTTTG	-----
1-30 Gm Gm	(708)	TTTCGGGCTTTG	GA-----
1-45 Gm Gm	(703)	TTTCGGGCTTTG	-----
Regent	(738)	TTTCGGGCTTTG	-----
Dornfelder	(704)	TTTCGGGCTTTG	GA-----
Kerner	(708)	TTTCGGGCTTTG	GAATC-----
Müller-Thurgau	(696)	TTTCGGGCTTTG	GAATCATAATGGGT-----
Muskateller	(729)	TTTCGGGCTTTG	GAATCATA-----
Riesling	(708)	TTTCGGGCTTTG	GA-----
Dunkelfelder	(702)	TTTCGGGCTTTG	-----
Traminer rot	(738)	TTTCGGGCTTTG	GAATCATAATGGGT-----
Silvaner	(704)	TTTCGGGCTTTG	-----
Felicia	(698)	TTTCGGGCTTTG	-----
Grauburgunder	(693)	TTTCGGGCTTTG	-----
Schwarzriesling	(667)	TTTCGGGCTTTG	-----
Dakapo	(774)	TTTCGGGCTTTG	GAATCATAATGGGTAGGCTCGTGGTCAACTAATTTAATGA
St. Laurent	(693)	TTTCGGGCTTTG	-----
Villarlis	(701)	TTTCGGGCTTTG	GAAT-----
18 Gm Gm	(701)	TTTCGGGCTTTG	GA-----
18 Gm Hm	(701)	TTTCGGGCTTTG	GA-----
INRA 777 Gm	(696)	TTTCGGGCTTTG	-----
INRA 777 Hm	(696)	TTTCGGGCTTTG	-----
54 Gm Gm	(690)	TTTCGGGCTTTG	-----

9.3 Sequenzen für das Kandidatengen ERECTA

	1	100
Harslevelue	(1)	-----
Arbane	(1)	-----AGT
Koshu	(1)	-----
Räuschling	(1)	-----T
Black Rose	(1)	-----T
Cardinal	(1)	-----TT CAGT
1-84 Gm Gm	(1)	-----TT CAGT
1-84 Gm Hm	(1)	-----TT CAGT
M242 Hm	(1)	-----
1-30 Gm Gm	(1)	-----TT CAGT
1-45 Gm Gm	(1)	-----TT CAGT
Regent	(1)	-----TT CAGT
Dornfelder	(1)	-----TT CAGT
Kerner	(1)	-----TT CAGT
Müller-Thurgau	(1)	-----
Muskateller	(1)	-----
Riesling	(1)	-----TT CAGT
Dunkelfelder	(1)	-----
Traminer rot	(1)	-----CAGT
Silvaner	(1)	-----
Felicia	(1)	-----CAGT
Grauburgunder	(1)	-----CAGT
Portugieser	(1)	-----TT CAGT
Schwarzriesling	(1)	-----TT CAGT
Dakapo	(1)	-----
St. Laurent	(1)	-----
Villaris	(1)	-----CAGT
18 Gm Gm	(1)	-----CAGT
18 Gm Hm	(1)	-----CAGT
INRA 777 Gm	(1)	-----
INRA 777 Hm	(1)	-----
54 Gm Gm	(1)	-----ST
	101	200
Harslevelue	(1)	-----CA STIGTTCG
Arbane	(4)	-----RKKTTTCYC
Koshu	(1)	-----WMA RTRTTTCYC
Räuschling	(2)	-----KCA STIGTTCG
Black Rose	(2)	-----CA STIGTTCG
Cardinal	(7)	-----CA STIGTTCG
1-84 Gm Gm	(7)	-----CA STIGTTCG
1-84 Gm Hm	(7)	-----CA STIGTTCG
M242 Hm	(1)	-----CA STIGTTCG
1-30 Gm Gm	(7)	-----CA STIGTTCG
1-45 Gm Gm	(7)	-----CA STIGTTCG
Regent	(7)	-----CA STIGTTCG
Dornfelder	(7)	-----CA STIGTTCG
Kerner	(7)	-----CA STIGTTCG
Müller-Thurgau	(1)	-----CA STIGTTCG
Muskateller	(1)	-----CA STIGTTCG
Riesling	(7)	-----CA STIGTTCG
Dunkelfelder	(1)	-----CA STIGTTCG
Traminer rot	(1)	-----CA STIGTTCG
Silvaner	(1)	-----CA STIGTTCG
Felicia	(5)	-----CA STIGTTCG
Grauburgunder	(7)	-----CA STIGTTCG
Portugieser	(5)	-----CA STIGTTCG
Schwarzriesling	(7)	-----CA STIGTTCG
Dakapo	(1)	-----TGTTATA TTCTGATTITTTTTTTTCG
St. Laurent	(1)	-----
Villaris	(5)	-----CA STIGTTCG
18 Gm Gm	(5)	-----CA STIGTTCG
18 Gm Hm	(5)	-----CA STIGTTCG
INRA 777 Gm	(1)	-----CA STIGTTCG
INRA 777 Hm	(1)	-----CA STIGTTCG
54 Gm Gm	(3)	-----CA STIGTTCG
	201	300
Harslevelue	(94)	-----TTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Arbane	(100)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Koshu	(67)	-----TTT
Räuschling	(98)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Black Rose	(97)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Cardinal	(102)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
1-84 Gm Gm	(103)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
1-84 Gm Hm	(103)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
M242 Hm	(90)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
1-30 Gm Gm	(92)	-----
1-45 Gm Gm	(103)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Regent	(103)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Dornfelder	(103)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Kerner	(103)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Müller-Thurgau	(72)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Muskateller	(63)	-----
Riesling	(92)	-----
Dunkelfelder	(1)	-----
Traminer rot	(103)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Silvaner	(94)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Felicia	(103)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Grauburgunder	(103)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Portugieser	(105)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Schwarzriesling	(103)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
Dakapo	(34)	-----
St. Laurent	(1)	-----
Villaris	(101)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
18 Gm Gm	(103)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
18 Gm Hm	(103)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
INRA 777 Gm	(99)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
INRA 777 Hm	(99)	-----TTTAGCAITTAGCTTAGATCCCAAATTCAAITTAATTTCTGATTGATTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT
54 Gm Gm	(101)	-----TTTAGCAITTTAAAGAAJAACAACTGCTGCAGAGCTACTTTTTGATGGCTGAGGGCAIT

301
 Harslevelue (194) CTCAAAGGGATCACC...
 Arbane (200) CTCAAAGGGATCACC...
 Koshu (70) CTCAAAGGGATCACC...
 Rauschling (198) CTCAAAGGGATCACC...
 Black Rose (197) CTCAAAGGGATCACC...
 Cardinal (202) CTCAAAGGGATCACC...
 1-84 Gm Gm (203) CTCAAAGGGATCACC...
 1-84 Gm Hm (203) CTCAAAGGGATCACC...
 M242 Hm (190) CTCAAAGGGATCACC...
 1-30 Gm Gm (92) CTCAAAGGGATCACC...
 1-45 Gm Gm (203) CTCAAAGGGATCACC...
 Regent (203) CTCAAAGGGATCACC...
 Dornfelder (203) CTCAAAGGGATCACC...
 Kerner (203) CTCAAAGGGATCACC...
 Müller-Thurgau (172) CTCAAAGGGATCACC...
 Muskateller (63) CTCAAAGGGATCACC...
 Riesling (92) CTCAAAGGGATCACC...
 Dunkelfelder (1) CTCAAAGGGATCACC...
 Traminer rot (203) CTCAAAGGGATCACC...
 Silvaner (194) CTCAAAGGGATCACC...
 Felicia (203) CTCAAAGGGATCACC...
 Grauburgunder (203) CTCAAAGGGATCACC...
 Portugieser (205) CTCAAAGGGATCACC...
 Schwarzriesling (203) CTCAAAGGGATCACC...
 Dakapo (34) CTCAAAGGGATCACC...
 St. Laurent (1) CTCAAAGGGATCACC...
 Villaris (201) CTCAAAGGGATCACC...
 18 Gm Gm (203) CTCAAAGGGATCACC...
 18 Gm Hm (203) CTCAAAGGGATCACC...
 INRA 777 Gm (199) CTCAAAGGGATCACC...
 INRA 777 Hm (199) CTCAAAGGGATCACC...
 54 Gm Gm (163) CTCAAAGGGATCACC...

401
 Harslevelue (294) TTTCCTCGGATGTT...
 Arbane (300) TTTCCTCGGATGTT...
 Koshu (70) TTTCCTCGGATGTT...
 Rauschling (298) TTTCCTCGGATGTT...
 Black Rose (297) TTTCCTCGGATGTT...
 Cardinal (302) TTTCCTCGGATGTT...
 1-84 Gm Gm (303) TTTCCTCGGATGTT...
 1-84 Gm Hm (303) TTTCCTCGGATGTT...
 M242 Hm (290) TTTCCTCGGATGTT...
 1-30 Gm Gm (191) TTTCCTCGGATGTT...
 1-45 Gm Gm (303) TTTCCTCGGATGTT...
 Regent (303) TTTCCTCGGATGTT...
 Dornfelder (303) TTTCCTCGGATGTT...
 Kerner (303) TTTCCTCGGATGTT...
 Müller-Thurgau (272) TTTCCTCGGATGTT...
 Muskateller (63) TTTCCTCGGATGTT...
 Riesling (155) TTTCCTCGGATGTT...
 Dunkelfelder (10) TTTCCTCGGATGTT...
 Traminer rot (303) TTTCCTCGGATGTT...
 Silvaner (294) TTTCCTCGGATGTT...
 Felicia (303) TTTCCTCGGATGTT...
 Grauburgunder (303) TTTCCTCGGATGTT...
 Portugieser (305) TTTCCTCGGATGTT...
 Schwarzriesling (303) TTTCCTCGGATGTT...
 Dakapo (34) TTTCCTCGGATGTT...
 St. Laurent (1) TTTCCTCGGATGTT...
 Villaris (301) TTTCCTCGGATGTT...
 18 Gm Gm (303) TTTCCTCGGATGTT...
 18 Gm Hm (303) TTTCCTCGGATGTT...
 INRA 777 Gm (299) TTTCCTCGGATGTT...
 INRA 777 Hm (299) TTTCCTCGGATGTT...
 54 Gm Gm (263) TTTCCTCGGATGTT...

501
 Harslevelue (394) CCGGCTCAATGGG...
 Arbane (400) CCGGCTCAATGGG...
 Koshu (70) CCGGCTCAATGGG...
 Rauschling (398) CCGGCTCAATGGG...
 Black Rose (397) CCGGCTCAATGGG...
 Cardinal (402) CCGGCTCAATGGG...
 1-84 Gm Gm (403) CCGGCTCAATGGG...
 1-84 Gm Hm (403) CCGGCTCAATGGG...
 M242 Hm (390) CCGGCTCAATGGG...
 1-30 Gm Gm (291) CCGGCTCAATGGG...
 1-45 Gm Gm (403) CCGGCTCAATGGG...
 Regent (403) CCGGCTCAATGGG...
 Dornfelder (403) CCGGCTCAATGGG...
 Kerner (403) CCGGCTCAATGGG...
 Müller-Thurgau (372) CCGGCTCAATGGG...
 Muskateller (63) CCGGCTCAATGGG...
 Riesling (255) CCGGCTCAATGGG...
 Dunkelfelder (110) CCGGCTCAATGGG...
 Traminer rot (403) CCGGCTCAATGGG...
 Silvaner (394) CCGGCTCAATGGG...
 Felicia (403) CCGGCTCAATGGG...
 Grauburgunder (403) CCGGCTCAATGGG...
 Portugieser (405) CCGGCTCAATGGG...
 Schwarzriesling (403) CCGGCTCAATGGG...
 Dakapo (79) CCGGCTCAATGGG...
 St. Laurent (83) CCGGCTCAATGGG...
 Villaris (401) CCGGCTCAATGGG...
 18 Gm Gm (403) CCGGCTCAATGGG...
 18 Gm Hm (403) CCGGCTCAATGGG...
 INRA 777 Gm (399) CCGGCTCAATGGG...
 INRA 777 Hm (399) CCGGCTCAATGGG...
 54 Gm Gm (363) CCGGCTCAATGGG...

	901	1000
Harslevelue	(794) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Arbane	(794) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATGT-----	
Koshu	(794) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Räuschling	(793) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Black Rose	(805) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Cardinal	(821) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATGTGCGGTACACCGCA-----	
1-84 Gm Gm	(794) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
1-84 Gm Hm	(794) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
M242 Hm	(791) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
1-30 Gm Gm	(804) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATGTGCGGTACACCGC-----	
1-45 Gm Gm	(790) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Regent	(791) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Dornfelder	(794) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Kerner	(791) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Müller-Thurgau	(791) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Muskateller	(791) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Riesling	(791) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Dunkelfelder	(793) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Traminer rot	(792) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Silvaner	(793) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Felicia	(793) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Grauburgunder	(791) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Portugieser	(804) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATGTGCGGTACACCGC-----	
Schwarzriesling	(793) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Dakapo	(790) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
St. Laurent	(793) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
Villaris	(794) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
18 Gm Gm	(793) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
18 Gm Hm	(793) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
INRA 777 Gm	(791) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	
54 Gm Gm	(791) TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAATATG-----	

9.5 Sequenzen für das Kandidatengen bZiP

	1	100
1-84 Gm Gm Allel 1	(1) TGTAAACGAAGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
1-84 Gm Hm Allel 1	(1) TGTAAACGAAGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
1-30 Gm Gm Allel 1	(1) TGTAAACGAAGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
1-45 Gm Gm Allel 1	(1) TGTAAACGAAGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
18 Gm Hm Allel 1	(1) TGTAAACGAAGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
Inra 777 Hm Allel 1	(1) TGTAAACGAAGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
Inra 777 Gm Allel 1	(1) TGTAAACGAAGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
1-84 Gm Gm Allel 2	(1) TGTAAACGAAGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
1-30 Gm Gm Allel 2	(1) TGTAAACGAAGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
18 Gm Gm Allel 2	(1) TGTAAACGAAGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
Inra 777 Gm Allel 2	(1) TGTAAACGAAGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
Inra 777 Hm Allel 2	(1) TGTAAACGAAGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
	101	200
1-84 Gm Gm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACCTAGTAAAGGAGCCACCCCTTTAAAGGGAGAAAATATCTTAATAATTTTATAA	
1-84 Gm Hm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACCTAGTAAAGGAGCCACCCCTTTAAAGGGAGAAAATATCTTAATAATTTTATAA	
1-30 Gm Gm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACCTAGTAAAGGAGCCACCCCTTTAAAGGGAGAAAATATCTTAATAATTTTATAA	
1-45 Gm Gm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACCTAGTAAAGGAGCCACCCCTTTAAAGGGAGAAAATATCTTAATAATTTTATAA	
18 Gm Hm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACCTAGTAAAGGAGCCACCCCTTTAAAGGGAGAAAATATCTTAATAATTTTATAA	
Inra 777 Hm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACCTAGTAAAGGAGCCACCCCTTTAAAGGGAGAAAATATCTTAATAATTTTATAA	
Inra 777 Gm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACCTAGTAAAGGAGCCACCCCTTTAAAGGGAGAAAATATCTTAATAATTTTATAA	
1-84 Gm Gm Allel 2	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACCTAGTAAAGGAGCCACCCCTTTAAAGGGAGAAAATATCTTAATAATTTTATAA	
1-30 Gm Gm Allel 2	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACCTAGTAAAGGAGCCACCCCTTTAAAGGGAGAAAATATCTTAATAATTTTATAA	
18 Gm Gm Allel 2	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACCTAGTAAAGGAGCCACCCCTTTAAAGGGAGAAAATATCTTAATAATTTTATAA	
Inra 777 Gm Allel 2	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACCTAGTAAAGGAGCCACCCCTTTAAAGGGAGAAAATATCTTAATAATTTTATAA	
Inra 777 Hm Allel 2	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACCTAGTAAAGGAGCCACCCCTTTAAAGGGAGAAAATATCTTAATAATTTTATAA	
	201	300
1-84 Gm Gm Allel 1	(201) ATAAAGAAATTAAGTAATTAAGAGGAATATAATATTAAGGAAATGCGCACGAGGAGAGAAAATGAAAATACTAATAAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
1-84 Gm Hm Allel 1	(201) ATAAAGAAATTAAGTAATTAAGAGGAATATAATATTAAGGAAATGCGCACGAGGAGAGAAAATGAAAATACTAATAAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
1-30 Gm Gm Allel 1	(201) ATAAAGAAATTAAGTAATTAAGAGGAATATAATATTAAGGAAATGCGCACGAGGAGAGAAAATGAAAATACTAATAAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
1-45 Gm Gm Allel 1	(201) ATAAAGAAATTAAGTAATTAAGAGGAATATAATATTAAGGAAATGCGCACGAGGAGAGAAAATGAAAATACTAATAAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
18 Gm Hm Allel 1	(201) ATAAAGAAATTAAGTAATTAAGAGGAATATAATATTAAGGAAATGCGCACGAGGAGAGAAAATGAAAATACTAATAAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
Inra 777 Hm Allel 1	(201) ATAAAGAAATTAAGTAATTAAGAGGAATATAATATTAAGGAAATGCGCACGAGGAGAGAAAATGAAAATACTAATAAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
Inra 777 Gm Allel 1	(201) ATAAAGAAATTAAGTAATTAAGAGGAATATAATATTAAGGAAATGCGCACGAGGAGAGAAAATGAAAATACTAATAAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
1-84 Gm Gm Allel 2	(201) ATAAAGAAATTAAGTAATTAAGAGGAATATAATATTAAGGAAATGCGCACGAGGAGAGAAAATGAAAATACTAATAAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
1-30 Gm Gm Allel 2	(201) ATAAAGAAATTAAGTAATTAAGAGGAATATAATATTAAGGAAATGCGCACGAGGAGAGAAAATGAAAATACTAATAAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
18 Gm Gm Allel 2	(201) ATAAAGAAATTAAGTAATTAAGAGGAATATAATATTAAGGAAATGCGCACGAGGAGAGAAAATGAAAATACTAATAAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
Inra 777 Gm Allel 2	(201) ATAAAGAAATTAAGTAATTAAGAGGAATATAATATTAAGGAAATGCGCACGAGGAGAGAAAATGAAAATACTAATAAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
Inra 777 Hm Allel 2	(201) ATAAAGAAATTAAGTAATTAAGAGGAATATAATATTAAGGAAATGCGCACGAGGAGAGAAAATGAAAATACTAATAAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
	301	400
1-84 Gm Gm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAAAGGAAAGTCACGAAATATCCGT-----TTTTTTTTCTTTTCAATTTATCCAAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAAAGAAATAT	
1-84 Gm Hm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAAAGGAAAGTCACGAAATATCCGT-----TTTTTTTTCTTTTCAATTTATCCAAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAAAGAAATAT	
1-30 Gm Gm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAAAGGAAAGTCACGAAATATCCGT-----TTTTTTTTCTTTTCAATTTATCCAAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAAAGAAATAT	
1-45 Gm Gm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAAAGGAAAGTCACGAAATATCCGT-----TTTTTTTTCTTTTCAATTTATCCAAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAAAGAAATAT	
18 Gm Hm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAAAGGAAAGTCACGAAATATCCGT-----TTTTTTTTCTTTTCAATTTATCCAAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAAAGAAATAT	
Inra 777 Hm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAAAGGAAAGTCACGAAATATCCGT-----TTTTTTTTCTTTTCAATTTATCCAAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAAAGAAATAT	
Inra 777 Gm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAAAGGAAAGTCACGAAATATCCGT-----TTTTTTTTCTTTTCAATTTATCCAAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAAAGAAATAT	
1-84 Gm Gm Allel 2	(301) TTTATTTTATGAAAAGGAAAGTCACGAAATATCCGT-----TTTTTTTTCTTTTCAATTTATCCAAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAAAGAAATAT	
1-30 Gm Gm Allel 2	(301) TTTATTTTATGAAAAGGAAAGTCACGAAATATCCGT-----TTTTTTTTCTTTTCAATTTATCCAAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAAAGAAATAT	
18 Gm Gm Allel 2	(301) TTTATTTTATGAAAAGGAAAGTCACGAAATATCCGT-----TTTTTTTTCTTTTCAATTTATCCAAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAAAGAAATAT	
Inra 777 Gm Allel 2	(301) TTTATTTTATGAAAAGGAAAGTCACGAAATATCCGT-----TTTTTTTTCTTTTCAATTTATCCAAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAAAGAAATAT	
Inra 777 Hm Allel 2	(301) TTTATTTTATGAAAAGGAAAGTCACGAAATATCCGT-----TTTTTTTTCTTTTCAATTTATCCAAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAAAGAAATAT	

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Danksagung

Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.

– Johann Wolfgang von Goethe –

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Arbeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung des Instituts für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I der Justus – Liebig Universität Gießen und im Institut für Rebenzüchtung, Geilweilerhof des Julius Kühn Instituts in Siebeldingen.

Viele Menschen haben mich während dieser Zeit unterstützt und dazu beigetragen, dass ich mich sowohl wissenschaftlich als auch zwischenmenschlich sehr wohl gefühlt habe. Diesen Personen möchte ich im Folgenden danken.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Friedt bedanken, der es mir durch die Überlassung des Themas ermöglicht hat, diese Arbeit zu verfassen. Außerdem möchte ich mich für die Übernahme der Erstkorrektur an dieser Stelle bedanken.

Herrn Prof. Dr. R. Töpfer danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, für die Übernahme des zweiten Gutachtens, für die engagierte Diskussion der Ergebnisse und die ergiebige Korrektur des Manuskripts.

Frau Prof. Dr. E. Zyprian danke ich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe während meiner praktischen Labortätigkeit am Geilweilerhof, für die großartige Unterstützung und Betreuung während dieser Zeit, für die engagierte Diskussion der Ergebnisse und die ergiebige Korrektur des Manuskripts.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen meinen Kollegen im Verbundprojekt für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. E. Rühl von der Forschungsanstalt Geisenheim für die

Überlassung des Pflanzenmaterials und E. Schönhals für die Hilfe bei der Probennahme, die fotografische Dokumentation und für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Großen Dank schulde ich Frau M. Schneider, für die große Hilfe bei der Durchführung meiner praktischen Untersuchungen und für jegliche Hilfe, sowohl während, als auch außerhalb der Arbeitszeit.

Danken möchte ich ebenfalls meinen Kollegen Herrn Dr. L. Welter, Herrn M. Iselborn, Herrn D. Lampert, Herrn F. Schwander und Herrn A. Dürrhauer, die nicht nur Arbeitskollegen waren sondern auch Freunde wurden. Danke für die vielseitige Unterstützung in allen möglichen Dingen.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof, insbesondere meinen Laborkolleginnen Frau C. Welsch, Frau U. Müller, Frau C. Gleich, Frau H. Bennek, Frau U. Doll und Frau U. Scherer und den Laborkollegen Herrn A. Preiß und Herrn R. Wind für die tolle Zusammenarbeit, für das super Arbeitsklima im Labor und für allzeit bereite Hilfe in sämtlichen Laborfragen.

Herrn Dr. L. Hausmann und Herrn Dr. A. Kortekamp möchte ich dafür danken, dass sie stets ein offenes Ohr für alle kleineren und größeren Probleme hatten, und ihre stetige Diskussionsfreudigkeit.

Dank schulde ich weiterhin der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung für die finanzielle Unterstützung und somit für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich noch bei allen Menschen bedanken, die direkt oder indirekt am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren und die bisher nicht namentlich genannt wurden oder die ich vergessen habe. Besonderer Dank gilt hierbei meiner Familie, die mich in jeder Lebenslage unterstützt hat und durch die es mir erst ermöglicht wurde, meinen Weg bis hierher zu gehen. Mein letzter Dank gilt allen meinen Freunden, die mich sowohl in guten als auch in weniger guten Zeiten unterstützt und angetrieben haben, diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.