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, Ökotrophologie 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 / in situ 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
3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 64
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 64
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 67 68
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 67 68 68
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 67 68 68 68
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 67 68 68 69 69
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 67 68 68 69 69 71
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 67 68 68 69 71 72
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 67 68 68 69 71 72 73
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 67 68 68 69 71 72 73 73
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 67 68 68 69 71 72 73 73 75
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 67 68 68 69 71 72 73 73 75 76
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 67 68 68 69 71 72 73 73 75 76 79
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 67 68 68 69 71 72 73 73 75 76 79 83
 3.2.8.2 Klonierung und Transformation	61 64 67 68 68 69 71 72 73 73 75 76 79 83 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 Genexpressionse	daten.95
5.1.3 Eigene Microarray Ergebnisse	96
5.2 Untersuchte Kandidatengene aus der Literatur	97
5.3 Kandidatengene für `Lockerbeerigkeit'	
5.3.1 ERECTA (ER)	
5.3.2 SUPERSHOOT (SPS)	
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	
Danksagung	XXXIX
Lebenslauf	definiert.

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Chemikalien	29
Tab. 2: Enzyme	
Tab. 3: Gerät, Kits & Zubehör	
Tab. 4: Software	
Tab. 5: Standards	
Tab. 6: Klone für die Genexpressionsstudien	
Tab. 7: Probennahmezeitpunkte für differentielle Genexpressionsuntersuchun	gen41
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 20)07
und 2008	87
Tab. 17: Regulation der Kandidatengene in 2007 und 2008	
Tab. 18: SNPs in den möglichen Promotorsequenzen der Gene aus Vitis vinif	<i>era</i> 91

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Entwicklungsverlauf der Weinrebe	3
Abb. 2: Beerenentwicklung	4
Abb. 3: `Spätburgunder´ – Klonentypen	8
Abb. 4: Infloreszenzmorphologie bei Arabidopsis	11
Abb. 5: Photolithographisches Verfahren zur Erstellung eines in situ Microarrays.	18
Abb. 6: Arrayer mit einer Kassette von 8 pins	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 ± 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

	Milkrogromm
μy	Mikuoliter
μι	
A	Adenin
ADD.	Abbildung
BP	BREVIPEDICELLUS
bp	Basenpaar(e)
bZiP	Basic Leucine Zipper
C	Cystein
cDNA	copy DNA
cRNA	copy RNA
СТАВ	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	ERÉCTA
ESTs	Expressed Sequence Tags
EtOH	Ethanol
for	forward Primer
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
Gf	Geilweilerhof
Gm	Geisenheim
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCI	Salzsäure
HKG	House Keeping Genes
Hm	Hennenheim
kh	Kilohasennaar(e)
LAS	
IRR	Leucine - Rich Repeats
LiCI	Lithiumchlorid
	logarithmisch
M	Molar
mΔ	Milliampere
ma	Milligramm
min	Minuton
ml	Millilitor
mM	Millimalar
	Magazargar DNA
	Natriumoniorio
NaOH	Natriumnydroxid
ng	Nanogramm

Nanometer
Optische Dichte
Hydroxid
Polymerase Chain Reaction
Plant Expression Database
PENNYWISE
Polyvinylpyrrolidon
quantitative Real Time PCR
reverse Primer
REVOLUTA
Ribonukleinsäure
Ribonuklease
Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
ribosomale RNA
Reverse Transkriptase
Sekunde
Single Nucleotide Polymorphism
SUPERSHOOT
SHOOT MERISTEMLESS
Thymin
Annealing Temperatur
Tabelle
Tris – Acetat – EDTA – Puffer
Thermus aquaticus
<i>Melting</i> Temperatur
Tris(hydroxymethyl) – Aminomethan
Umdrehungen pro Minute
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, dass 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 gib 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 Wachsens, 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 Beereninhaltstoffe (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 Botrytisbefall 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 Fruchtansätze 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 Stielgerüstes 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 Modellpfanze Arabidopsis konnte den Genen LATERAL SUPPRESSOR (LAS) (Greb et al. 2003), REVOLUTA (REV) (Talbert et al. 1995) und SUPERSHOOT (SPS) (Tatikanjana 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 – Doppeltmutanten 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 Kandidatengenen, die während der Entwicklung der Trauben zwischen kompakten und lockerbeerigen Klonen differentiell exprimiert sind und somit eine lockere Struktur des Traubengerüstes bewirken können. Hierfür wurden relevantem an Pflanzenmaterial, Infloreszenzen und Traubengerüsten in verschiedenen Entwicklungsstadien, Genexpressionsanalysen molekularer mittels 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 gRT 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 unbekannten 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" beider Methoden ist der Transfer genannt. Das Prinzip von Nukleinsäurefragmenten aus einem Gel über Kapillarkräfte auf eine Nylon - oder Nitrozellulose – Membran. Die Nukleinsäurefragmente werden durch backen (bei

70 – 80 ℃) 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 Membrane 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 Probendichte 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 Combimatrix neu sind 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: Photolithographisches Verfahren zur Erstellung eines in situ Microarrays (Affymetrix)

Eine Einschränkung dieser Methode liegt in der Länge und Reinheit der DNA-Sonden. Photolitographische Verfahren erreichen eine Kopplungseffizienz p von ungefähr 98%. Bei einer Sequenzlänge s von 20 – 25 liegt die Ausbeute an korrekt synthetisierten Oligonukleotiden nach ps 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 Probendichten erzeugt werden; kommerziell erhältliche Chips enthalten bis zu 900.000 Oligonukleotid – Spots pro cm² (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 Seguenzen auf dem Chip oder mit anderen Genen aufweisen. Nur dadurch kann eine hohe Spezifizität 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 Spotdurchmesser 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 Spotdurchmesser von 25 – 100 µm lassen sich Arrays mit höherer Spotdichte 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 ℃ 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 Zyklenzahl (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 CT – Zykluszahl ("Cycle – Threshold") bezeichnet. Dieser markiert einen Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert. R_n^+ , R_n^- – normalisierte Fluoreszenz einer positiven, bzw. negativen Probe. ΔRn 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 $^{\circ}$ C Schritten von ca. 60 $^{\circ}$ C auf ca. 95 $^{\circ}$ 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 Gewebeund 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 Ausgangs-Konzentration 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
 N₀ = Nukleinsäure Anfangskonzentration
 Eⁿ = 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 MgCl₂ 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. $\Delta\Delta CT$ – 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 (ΔCT = CT Zielgen – CT Referenzgen). Nach dieser Normierung wird vom ΔCT Wert der experimentell behandelten Proben der ΔCT Wert einer Kontrolle abgezogen (ΔCT); man kommt zum sog. $\Delta\Delta CT$ 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^{$\Delta\Delta CP$} (Livak & Schmittgen 2001):

 $\Delta CT = CT$ Zielgen – CT Referenzgen

 $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ Behandlung – ΔCT Kontrolle Ratio= $2^{\Delta\Delta CT}$

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 $\Delta\Delta$ CT – Modell wurde das Effizienz – korrigierte relative Quantifizierungsmodell entwickelt (Pfaffl 2001).

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

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.

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

$$Ratio = (E_{Zielgen})^{\Delta CT_{Zielgen}(Kontrolle-Behandlung)}$$

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 auswertet 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).

 $Ratio = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta CT_{Zielgen}(Mittelwert_{Kontrolle} - Mittelwert_{Behandlung})}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta CT_{Zielgen}(Mittelwert_{Kontrolle} - Mittelwert_{Behandlung})}}$

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)
IsopropyI-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma – Aldrich (Traufkirchen)
Isoamylalkohol	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Sigma – Aldrich (Traufkirchen)
"Lichrosolv" H2O	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	Sigma – Aldrich (Traufkirchen)
(X – Gal)	

Tab. 2: Enzyme

Enzyme	Hersteller/Bezugsquelle
DNAse I	Qiagen (Hilden)
EcoR I	NEB (Frankfurt)
Hind III	NEB (Frankfurt)
RNAse I	Qiagen (Hilden)
<i>Taq</i> – 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

Amplifikat: 80 bp

18S:5' - GGG CAT TCG TAT TTC ATA GTC AGAG - 3'<math>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[']</sup>

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[']</sup>

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 TT**C 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 GT**C 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 AA**C 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>Eschericha coli</i> One Shot [®] DH5α [™]	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Eschericha 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 Zentrifuge 2K15, 4K15 Sigma: 12148, 12139, 12145, 12666 Rotoren: Qiagen/Sigma: 09100

Gelelektrophorese

Spannungsquelle:	Phero-STAB 0652	Biotec – Fischer (Reiskirchen)
	EC105	E – C – Apparatus Corporation
Kammern:	Midicell EC 350	E – C – Apparatus Corporation
	Minicell Submarine	Biotech Fischer (Reiskirchen)
Kämme und Gelträger		Biometra (Göttingen)

Spektroskopie/ -metrie

LKB Biochrom Ultraspec II Nanophotometer[™] LabelGuard[™] Microliter Cell, Lid 10, 50

REAL TIME PCR

7500 Fast Real Time PCR System Computer Optiplex Gx 280

Geldokumentation

Vertikalschüttler Modell Kühner Computer bluechip Dunkelhaube DH - 30/32 Transilluminator Bio View UST - 20M - 8E

Diverses

Abzug Autoklav 5050 ELVC Brutschrank B 20 Computer Optiplex GX 620 Drucker 5110cn Drucker LaserJet 2420 d GeneAmp PCR System 9700 Thermocycler Heißluftsterilisator FED 420 H₂O – Deionisationsanlage Pure Lab Plus Inkubationshaube Certomat[®] H Kühlschrank

Heraeus (Hanau) Sigma (Osterode am Harz) Sigma (Osterode am Harz) Qiagen (Hilden)

Biotech Fischer (Reiskirchen)

Pharmacia Biotech (Freiburg) Implen (München) Implen (München)

Applied Biosystems (Darmstadt) Dell (Frankfurt)

B.Braun (Melsungen) Bluechip (Meuselwitz) Biostep (Jahnsdorf) Biostep (Jahnsdorf)

Asecos (Gründau) Tuttnauer Systec (Wettenberg) Heraeus (Hanau) Dell (Frankfurt) Dell (Frankfurt) HP (Böblingen) Applied Biosystems (Darmstadt) Binder (Tuttlingen) USF Seral (Ransbach-Baumbach) B. Braun Biotech (Melsungen) Bauknecht (Stuttgart)

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

Produkt

Mikrowelle Micromat pH - Meter Elektrode 662 - 1790 Stromgerät pH – Meter Thermomixer 5436 Tiefkühltruhe Tischschüttler Certomat[®] R Vortex – 2 Genie Waage Precision Advanced Wärmeplatten/Magnetrührer RCT & RCO Wasserbad MP 5 Wasserbad U3

Pipetten

Kolbenhubpipetten Pipetman: $0,2 - 2 \mu$; $0,5 - 10 \mu$; $2 - 20 \mu$; 20 – 100 µl; 30 – 200 µl & 200 – 1000 µl Mehrkanal – Research – Pipette 0,5 – 10 µl Finnpipette, 5 ml

Material

Alu – Folie Autoklavierband Drigalski - Spatel Glasflaschen mit Schraubdeckel (50, 100, 250, 1000 & 2000 ml) Handschuhe Latex Magnetrührer Standard Set MicroAmp[™] Fast Optical 96-Well Reaction Plates MicroAmp[™] Optical Adhesive Film Mörser & Pistille Parafilm Petrischalen, 9 cm Durchmesser Pipettenspitzen D10, D200 & D1000 Polypropylen Mikroreaktionsgefäße 0,2 ml Polypropylen Mikroreaktionsgefäße (0,5; 1,5 & 2,0 ml) Polypropylen Zentrifugenröchrchen (15 & 50 ml) Polypropylenbecher mit Schraubdeckel (28 und 50 ml) Quali - PCR - Platten TipOne[®] Pipettenspitzen Ultravette Mikro, Zentrumshöhe 15 mm

Hersteller/Bezuasauelle

AEG (Nürnberg) VWR (Darmstadt) WTW (Weilheim) Eppendorf (Hamburg) Kryotec (Hamburg) B. Braun Biotech (Melsungen) Scientific Industries (USA) OHAUS (Giessen) JKA (Staufen) Julabo (Seelbach) Julabo (Seelbach)

Gilson (Limburg)

Eppendorf (Hamburg) Labsystems (Helsinki)

VWR (Darmstadt) VWR (Darmstadt) VWR (Darmstadt) Schott (Jena)

Diagonal (Münster) neoLab (Heidelberg) Applied Biosystems (Darmstadt) Applied Biosystems (Darmstadt) VWR (Darmstadt) VWR (Darmstadt) VWR (Darmstadt) Gilson (Limburg) ABgene (Hamburg) Eppendorf (Hamburg)

VWR (Darmstadt)

Sigma (Osterode)

Kisker (Steinfurt) StarLab (Ahrensberg) VWR (Darmstadt)

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

Produkt

Kits

7500 Fast Real Time PCR Systems Spectral Calibration Kit I 7500 Fast Real Time PCR Systems Spectral Calibration Kit II **DNeasy Plant Mini Kit** Gene Set[™] Plasmid Miniprep Kit GeneAmp Carry - Over Prevention Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit InnuPREP Plant RNA Kit MinElute[®] Gel Extraktion Kit Invisorb[®] Spin Plant RNA mini Kit MinElute[®] PCR Purification Kit NucleoSpin[®] RNA Kit Power SYBR® Green PCR Master Mix Pure Yield[™] Plasmid Miniprep Kit **QIAGEN Plasmid Mini Kit** RNase - Free DNase Set **RNeasy MinElute Cleanup Kit** TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing UltraClean[™] Plant RNA Isolation Kit

3.1.6 Software

Tab. 4: Software

Produkt

Frei verfügbare Software

GrapePLEXdb/BarleyBase BestKeeper[®] Software (Pfaffl et al. 2004) geNorm (Vandesompele et al. 2002) REST 2005 (Pfaffl et al. 2002) National Center for Biotechnology Information BioEdit version 7.0.5.3 (Hall 1997) R version 2.4.1 Tinn – R 1.19.2.3 (Faria et al.2001) GeneChip[®] Operating Software Genscan 123 Genomics Vector NTI 10

Software

7500 Fast System SDS 1.3.1 Primer Express 3.0 PVC 5.2.2.2 Excel, Word, PowerPoint, Access 2003 Argus X1 5.2.1

Hersteller/Bezugsquelle

Applied Biosystems (Darmstadt)

Applied Biosystems (Darmstadt)

Qiagen (Hilden) Fermentas (Leon – Rot) Applied Biosystems (Darmstadt) Applied Biosystems (Darmstadt) Analytika Jena (Jena) Qiagen (Hilden) Invitek (Berlin) Qiagen (Hilden) Macherey - Nagel (Düren) Applied Biosystems (Darmstadt) Promega (Mannheim) Qiagen (Hilden) Qiagen (Hilden) Qiagen (Hilden) Invitrogen (Karlsruhe) MoBio (Carlsbad, USA)

Bezugsquelle

www.plexdb.org www.Gene-Quantification.com www.Gene-Quantification.com www.Gene-Quantification.com www.ncbi.nlm.nih.gov www.mbio.nscu.edu/BioEdit/BioEdit.html www.r-projeCT.org www.sciviews.org/Tinn-R/ Applied Biosystems (Darmstadt) www.genes.mit.edu/GENSCAN.html http://123genomics.com/files/analysis.html Invitrogen (Karlsruhe)

Applied Biosystems (Darmstadt) Applied Biosystems (Darmstadt) Implen (München) Microsoft (Redmond,USA) Biostep (Jahnsdorf)

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)
λPSTΙ	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 Bezug auf im 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 Versuchsflächen 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 Beerenstielchen, und bildet somit kompakte Trauben. Im Gegensatz dazu bildet der Klon 1–84 Gm längere Beerenstielchen, 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 aussehr 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 <u>B</u>iologische Bundesanstalt für Land– und Forstwirtschaft, <u>B</u>undessortenamt und <u>CH</u>emische Industrie. Diese Skala ist in Makro– und Mikrostadien unterteilt.

BBCH Stadium	53	55	57	61	65
	AN AN		8 Co		
Mikrostadium	Gescheine (Infloreszenzen) deutlich sichtbar	Gescheine (Infloreszenzen) vergrößern sich; Einzelblüten sind dicht zusammen gedrängt	Gescheine (Infloreszenzen) sind voll entwickelt; Einzel- blüten spreitzen sich ab	Beginn der Blüte: 10% der Blütenkäppchen sind ab- geworfen	Vollblüte: 50% der Blütenkäppchen sind ab- geworfen
Makrostadium	Er	scheinen der Blütenanl	age	BI	üte
Tag der Probenahme	11.05.2006	29.05.2006	6 13.06.2006 15.0		16.06.2006
BBCH Stadium	69	73	77	81	85
Mikrostadium	Ende der Blüte	Beeren schrotkorngross; Trauben beginnen sich	Beginn des Trauben- schlusses	Beginn der Reife; Beeren beginnen hell zu werden	Weichwerden der Beeren
		abzusenken		(bzw. sich zu verfärben)	
Makrostadium	Blüte	abzusenken Fruchter	Itwicklung	(bzw. sich zu verfärben) Frucht- und	Samenreife

Tab. 7: Probennahmezeitpunkte für differenzielle Genexpressionsuntersuchungen

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-

42

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 Probensa	ıtzes für u	ntersc	hiedliche	e Ausp	orägung	der Tra	aubensti	ruktur.	Die in
rot geschriebenen	Sortennamen	stehen fü	r rote	Sorten,	rosa	steht für	Róse	und gri	in 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 V. sylvestris oder (V. sylvestris 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 hitzelabilen 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 ℃ im Wasserbad vorwärmen.
- Etwa 1 g gemörsertes und gefrorenes Pflanzenmaterial zum vorgewärmten Extraktionspuffer geben, auf dem Vortexer gründlich mischen und 10 min bei 65 ℃ 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 ℃ 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 ℃ 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 ℃ 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 Spektralphotometermeter 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:

- ≤ 87,5 μl 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 (700µl) 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 MultiScribeTM 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 ℃ erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA anschließend bei 37 ℃ für 120 min und die Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 85 ℃ für 5 sek. Als Kontrolle wurde ein identischer Reaktionsansatz ohne MultiScribeTM 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 f
 ür 1 min bei 8.000 x g zentrifugieren. Durchlauf und Eppendorf – Gef
 äß 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 f
 ür 2 min bei 18.500 x g zentrifugieren. Durchlauf und Eppendorf – Gef
 ä
 ß verwerfen.
- 100 μl H₂O direkt auf die Membran geben und f
 ür 5 min bei Raumtemperatur inkubieren. 1 min bei 18.500 x g zentrifugieren.
- Erneut 100 μl H₂O direkt auf die Membran geben und f
 ür 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 gualitativen und guantitativen 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 A₂₃₀/A₂₆₀ gibt Auskunft über die Verunreinigung mit phenolischen Verbindungen, der Quotient A₂₆₀/A₂₈₀ über die Verunreinigung mit Proteinen. Der Quotient A₂₃₀/A₂₆₀ sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen, der Quotient A₂₆₀/A₂₈₀ 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 NanoPhotometer[™] von Implen (München) durchgeführt.

3.2.4.2 Elektrophoretische Konzentrationsbestimmung

Hierzu wurden definierte Konzentrationen an Lambda – DNA (120 ng/µl, 80 ng/µl und 40 ng/µl) 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 ℃	10 min	1x
Denaturierung	95 ℃	ך 1 min	
Primeranlagerung	variabel	1 min	35x
Synthese	72 ℃	1 min	
Finale Synthese	72 ℃	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 (Tm) der Primer abhängig, bei der mindestens 50 % der Primer an die Ziel – DNA gebunden vorliegen. Die Schmelztemperatur wurde mathematisch mit Hilfe der Gleichung: Tm = 2 °C x (A+T) + 4 °C x (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 (Tm 65 ± 7 °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 ℃	10 min		1x
Denaturierung	95 ℃	1 min	٦	
Primeranlagerung	65 ± 7 ℃	1 min	}	35x
Synthese	72 °C	1 min	J	
Finale Synthese	72 ℃	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 ℃ 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 ℃ 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. Unterschied normalen PCR lieat Der zur also ausschließlich am Temperaturzyklus. Die Bedingungen für eine Touchdown – PCR waren

beispielhaft wie folgt:

Initiale Denaturierung	95 ℃	10 min	1x
Denaturierung	95 ℃	ן 1 min	
Anlagerung	72 ℃ (-1,5℃/Zyklus)	1 min	10x
Synthese	72 ℃	1 min ^J	
Denaturierung	95 ℃	ך 1 min	
Synthese	℃ 00	1 min >	25x
Amplifikation	72 ℃	1 min J	
Schlusspolymerisation	72 ℃	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 μ M), dNTP – Mix (je 0,2 mM), sowie *Taq* – DNA – Polymerase (0,1 U). Der Reaktionsansatz wurde mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 μ I 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 ℃	10 min	1x
Denaturierung	95 ℃	ך 1 min	
Primeranlagerung	58 ℃	1 min	35x
Synthese	72 ℃	1 min	
Finale Synthese	72 ℃	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 transkriptiert 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.

57

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 $\Delta\Delta$ CT Methode. Hier wird die unterschiedliche Expression als n – fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta$ CT Wertes angegeben. Wichtig bei diesem Verfahren ist eine gleiche Effizienz der beiden zu vergleichenden PCR – Reaktionen. Die CT – Werte werden hierbei einfach subtrahiert (Δ CT). Die beiden Δ CT Werte der einzelnen Gruppen (kompakt/locker) werden voneinander abgezogen (ΔΔCT Wert) und in die Gleichung n – fache Expression (Gruppe A zu Gruppe B) = $2^{-\Delta\Delta CT}$ 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 Kandidatengen eine Kontrolle ohne Matrize eingesetzt.

3.2.7.4.2 Genexpressionsanalyse

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

Initiale Denaturierung	95 ℃	10 min		1x
Denaturierung	95 ℃	0:15 min	٦	40v
Primeranlagerung/Synthese	58 ℃	1 min	\int	407

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

59

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.

60

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 Invitogen (*Karlsruhe*) verwendet. Die Klone, die positiv auf das gewünschte DNA – Fragment getestet werden konnten, wurden im Auftrag von GATC (*Koblenz*) 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 μ l PCR – Produkt mit 0,5 μ l 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 DH5 α transformiert.

3.2.8.2.2 E. coli Transformation

E. coli – Zellen des Stammes DH5 α 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 ℃ 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
	Sterilfiltieren

	Anschließend aliquotieren und bei – 20 $^{\circ}$ C
	einlagern
LB – Medium, flüssig:	10 g Trypton
	5 g Natriumchlorid
	5 g Hefeextrakt
	mischen und autoklavieren (121 °C für 20 min.)
STET – Puffer :	50 mM Tris – HCl , pH 8,0
	50 mM EDTA, pH 8,0
	8% (w/v) Saccharose
	Auf 250 ml mit ddH ₂ O auffüllen
	mischen und autoklavieren (121 °C für 20 min.)
	anschließend 5 % TritonX100 hinzugeben

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 Beerenstielchen 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 Beerenstielchen 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 Aromaausprägung, 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 Invitek (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 Phenolund 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 LiCI – Fällung eliminiert werden. LiCI 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 denaturiendes Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 16).

$\mathbb{A}_{\mathbb{Q}}^{\mathbb{Q}} = \mathbb{Q} =$

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 Probennahmezeitpunkt: 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 Probendaten (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 μ g RNA gelöst in 10 μ I H₂O.

Nr.	ID Klon		BBCH	Konzentration [ng/µl]	Volumen [µl]	OD 260/280
1	1	18 Gm	57 a	970	10	2,1
2	12	18 Gm	57 b	870	10	2,17
3	13	1–84 Gm	57 a	1060	10	2,03
4	14	1–84 Gm	57 b	1040	10	2,16
5	1	18 Gm	65 a	1130	10	1,83
6	112	18 Gm	65 b	1120	10	2,09
7	113	1–84 Gm	65 a	1430	10	1,96
8	114	1–84 Gm	65 b	690	10	2,15
9	115	`Cardinal'	65 a	1090	10	2,06
10	116	`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	1114	1–84 Gm	73 b	1200	10	2,05

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

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)
- Vergleich der beiden Klone 18 Gm und 1–84 Gm mit der Tafeltraube Cardinal[´] zum Entwicklungsstadium BBCH 65 (Vollblüte)
- 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 "fold change" Wert höheren 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 ± 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 ± 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 guantitativer 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%.

Genabkürzung	GenBank	Kodiertes Protein	RT – PCR Produkt bp / PCR – Effizienz*
SAND	CF405409	SAND Familie Protein	76 /1,948
UBC	EC922622	Ubiquitin C	75/1,978
alpha - Tubulin	EC930869	Tubulin alpha-3/alpha-5 Untereinheit	119/1,906
ß -Tubulin	EC922104	Tubulin beta-1 Untereinheit	86/1,985
GAPDH	CB973647	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	70/1,913
Actin	EC969944	Actin	82/1,694
MDH	EC921711	Malat Dehydrogenase	82/1,877
L2		ribosomales Protein	88/1,947
18S		ribosomale Untereinheit	80/1,803

Tab. 10: Getestete Referenzgene

* PCR – Effizienz mit LinRegPCR bestimmt

Mit der PCR – Effizienz und den CT – Werten, welche die Zykluszahl beschreiben, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, lassen sich mit Hilfe des Programms "geNorm" (Vandesompele et al. 2002) die stabilsten HKG bestimmen. Im Folgenden wurde jeweils das HKG mit der instabilsten Expression schrittweise aus der weiteren Analyse ausgeschlossen (Abbildung 19).





Abbildung 19: geNorm Ranking der getesteten HKGs.

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.

Chip - ID	Unigene	Homologie	p - Wert	fold change	E -Wert
1621585 at	CK138212	shoot-forming PKSE1 [Paulownia kawakamii]	0.00574	1.53	4.00E-31
1607465 at	CD797253	WBKY-type DNA binding protein 1 [Vitis vinifera]	0.00677	1,82	4 00E-18
1621456 at	CE403507	BING-H2 finger protein BHG1a-like [Orvza sativa]	0.00008	-1 70	5.00E-26
1606561 at	CE373333	basic helix-loon-helix DNA binding protein TCP2 [Arabidoosis thaliana]	0.00225	-1 64	5,00E-14
1616571 at	CE205416	zinc ion hinding [Arabidonsis thaliana]	0.00544	1 55	4.00E-21
1613707 at	CB912108	hZIP transcription factor hZIP126 [Glycine max]	0.00962	3.00	3.00E-07
1616226 at	CB002795		0.00302	-3.08	0,002 07
1613995 at	CB341658		0,00002	-3.02	
1621724_at	CB341760		0.00143	3.54	
1621724_at	CD009416		0,00140	4 10	
1619722 of	CD721662	unnamed protein product: hypothetical start [Modicage truncatula]	0,00040	2 16	2 00E 15
1618722_at	CE200140		0,00233	-2,10	3,00E-15
1622809_at	GF202148		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*.

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

Tab. 12: Ausgewählte Kandidatengene aus der Literatur

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 34 Gene eine Kinetik der Expression der ausgewählten über die Vegetationsperiode 2006 erstellt (siehe Abbildungen 22 – 24). Dazu wurden sechs Entwicklungszeitpunkte so ausgewählt, dass die Makrostadien "Erscheinen der "Fruchtentwicklung" Blütenanlage". "Blüte" und abgedeckt waren. Im Makrostadium "Erscheinen der Blütenanlage" wurde das Mikrostadium BBCH 57 "Gescheine sind vollständig ausgebildet" gewählt. Vom Makrostadium "Blüte" wurden die drei Mikrostadien 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.

Ergebnisse



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 differentielle Expression.





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 Kandidatengenen 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.

	Entwicklungsstadien								
Genbezeichnung	BBCH 57	BBCH 61	BBCH 65	BBCH 69	BBCH 73	BBCH 77	Summe		
SPS	х	х	-	х	х	х	5		
LAS	Х	х	-	х	х	х	5		
bZIP	Х	х	-	х	х	х	5		
STM	Х	х	-	-	х	х	4		
CD721663	Х	х	х	х	-	-	4		
ER	х	х	-	х	-	-	3		
PYN	Х	х	-	х	-	-	3		
CB341760	-	х	-	х	х	-	3		
CF203567	-	х	х	-	-	х	3		
CF512412	Х	х	-	-	-	х	3		
CF513596	Х	х	-	-	-	х	3		
CB341658	Х	-	-	-	х	х	3		
REV	х	-	-	-	х	-	2		
CLV1	-	-	-	-	х	х	2		
KNAT1	-	х	-	-	-	х	2		
SUP	-	-	-	-	х	х	2		
RHG1	-	-	-	-	х	х	2		
PSKF1	Х	-	-	-	х	-	2		
ZIB1	-	х	х	-	-	-	2		
TCP2	-	-	-	-	х	х	2		
CF512494	-	-	-	х	-	х	2		
CF512751	-	-	-	-	Х	Х	2		
MAX1	Х	-	-	-		-	1		
BLIND	-	-	х	-	-	-	1		
CF204825	-	-	-	-	-	Х	1		
WRKY1	-	-	-	-	х	-	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 Kandidatengenen 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 Kandidatengenen, 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 differentiell 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 Klongruppen ausgelistet.

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	$\downarrow \uparrow$	-	-	-	-
SPS .	0,00006	$\downarrow \uparrow$	-	-	-	-
R	0,005	$\downarrow \uparrow$	-	-	0,0005	$\downarrow \uparrow$
PKSF1	-	-	0,009	$\downarrow \uparrow$	-	-
bZP	0,007	$\downarrow \uparrow$	-	-	0,000007	$\downarrow \uparrow$
STM	-	-	-	-	0,018	$\downarrow \uparrow$
REV	-	-	-	-	0,037	$\downarrow \uparrow$

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.

Ergebnisse



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 differentiell exprimierten Zeitpunkten 2008 bestätigten fünf die Ergebnisse aus dem Versuchsjahr 2007 (siehe Tabelle 15, blau unterlegt).

Tab.	15: t-	Werte	der	signi	fikant	differen	tiell ex	prin	nierte	en Zeit	punl	kte 2	2008.	Rot	marki	ert s	sind	die
komp	akten	Klone,	grün	die	locke	rbeerige	n Klor	e. I	Blau	unterle	egt s	sind	die Z	Zeitpu	nkte,	wel	che	die
Ergeb	nisse	aus de	m Ve	rsucl	hsjahr	2007 be	estätig	en.										

Gen	BBCH 57	Regulation	BBCH 65	Regulation	BBCH 73	Regulation
LAS	0,0002	$\downarrow \uparrow$	-	-	-	-
SPS	0,009	$\downarrow \uparrow$	-	-	0,0003	$\downarrow \uparrow$
FR	-	-	-	-	0,002	$\downarrow \uparrow$
bZP	0,0002	$\downarrow \uparrow$	-	-	0,001	$\downarrow \uparrow$
STM	-	-	-	-	0,009	$\downarrow \uparrow$
REV	0,045	$\downarrow \uparrow$	-	-	-	-

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).

		2007		2008				
Gen	BBCH 57	BBCH 65	BBCH 73	BBCH 57	BBCH 65	BBCH 73		
SPS	XXX	-	-	XX	-	XXX		
LAS	XXX	-	-	XXX	-	-		
bZIP	XX	-	XXX	ххх	-	XX		
STM	-	-	x	-	-	XX		
CD721663	-	-	-	-	-	-		
CB341658	-	-	-	-	-	-		
REV	-	-	x	х	-	-		
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 PKSF1 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 PKSF1 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 gRT PCR wurden für jedes Kandidatengen die Expressionswerte in den einzelnen Entwicklungsstadien in Versuchsjahren beiden Standorte beiden an den 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	$\downarrow \uparrow$	-	-	-	-
SPS	0,001	$\downarrow \uparrow$	-	-	0,008	$\downarrow \uparrow$
BR	0,015	$\downarrow \uparrow$	-	-	0,0002	$\downarrow \uparrow$
bZiP	-	-	-	-	0,00002	$\downarrow \uparrow$
STM	-	-	-	-	0,012	$\downarrow \uparrow$
REV	0,012	$\downarrow \uparrow$	-	-	0,01	↓↑

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

4.5 Sequenzierung

Für die sechs Kandidatengene, LAS, SPS, bZiP, ER, STM und REV wurde mit der Software VectorNTI (Invitrogen, Karlsruhe) *in silico* der mutmaßliche Promotorbereich und die Position der 5'–UTR ("Untranslated Region") ermittelt.

Für die Promotorbereiche wurden flankierende Oligonukleotide entwickelt, mit denen je ein ca. 1000 bp langes Fragment mittels Touchdown – PCR im Probensatz `Lockerbeerigkeit´ (siehe 3.1.9) amplifiziert und anschließend direkt sequenziert wurde.

4.5.1 PCR – Produkt Sequenzierung

Bei vier der sechs Promotorenbereiche konnte eine eindeutige Sequenz für die sequenzierten DNA – Fragmente ermittelt werden. Bei den Kandidatengenen bZiP und LAS war die Direktsequenzierung nicht erfolgreich, da sich zwei Sequenzen überlagerten, was auf eine deutlich ausgeprägte Heterozygotie mit zwei verschiedenen Allelen hindeutet. In Abbildung 28 ist beispielhaft ein Teil der Sequenz des Kandidatengens SPS für neun der zehn Klone, die für die Genexpressionsanalysen verwendet wurden, abgebildet. Die Sequenzierung für den Klon INRA 777 vom Standort Heppenheim war nicht erfolgreich.

In den Sequenzen waren zwei SNPs ("Single Nucleotide Polymorphism") an Position 246 bp und 632 bp erkennbar, die eindeutig zwischen den lockerbeerigen und den kompakten Klonen differenzierten.



Abbildung 28: Ausschnitt aus der Sequenz des mutmaßlichen Promotorbereiches des Kandidatengen SPS. Grün dargestellt sind die lockerbeerigen Klone, rot die kompakten Klone. Ein deutlicher SNP besteht zwischen den lockeren und den kompakten Klonen an Position 246 bp. Der zweite SNP an Position 393 bp differenziert nicht die lockeren von den kompakten Klonen.

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* Kandidatengenen 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 (I = lockerbeerig; k = kompakt) assoziiert sind.

	Position	Ι	k												
SPS	246	Т	С	393	G	А	632	Т	Α	808	G	А			
BR	187	-	С	188	-	Α									
STM	183	Α	С	193	Α	-	194	С	-	670	G	Α	694	Α	Т
rev	241	С	Т	487	-	Т	592	С	Т						

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).



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 Invitogen (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.

Ergebnisse

		347
1-84 Cm Cm 211e1 1	(301)	
1-84 Gm Hm Allel 1	(301)	T T TA TT TT ATT GA AAA GGAAGTCACGAA TA TOCGTG TT TTT TT TT TCT TT TCA TA TTTTAT CCA AA CAG TA AAAAT AAAAAT AAAAAT AAAAAT AAAAAT AAAAATAA
1-30 Gm Gm Allel 1	(301)	TTTATTTATTGAAAAGGAAGTCACGAATATCCGT <mark>G</mark> TTTTTTTTT <mark>T</mark> CTTTTCATATTTATCCAAACAGTAAAAAAAAAAAAAAA
1-45 Gm Gm Allel 1	(301)	TT TATT TTATTGAAAAGGAAGTC ACGAA TATCC GIG TT TTT TTTT CT TTTCA TATTTATCCAAA CASTAAAATAAAA
IS GM HM AILEI I Tora 777 Hm Allel 1	(301)	1 I I A I I I A I I GAAAAGAAG ICAGGAA IA ICGI E II II II II II II II I I CAAACAG IAAAAA AAAAA AAAAA IAAAAAAAAAA
Inra 777 Gm Allel 1	(301)	T I TA TITTATTGAAAA GGAAG TCACGAA TATCCGTG TITTTITTT CTITTCA TA TITATCCAAA CAGTAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAGAAAGA
1-84 Gm Gm Allel 2	(301)	TTTATTTATTGAAAAGGAAGTCACGAATATCCGT <mark>-</mark> TTTTTTTT <mark>TC</mark> TTTCATATTTATCCAAACAGTAAAAAAAAAAAAAAAA
1-30 Gm Gm Allel 2	(301)	TTTATTTATTGAAAA GGAAGTCACGAA TATCCGT <mark>-</mark> TTTTTTTT <mark>T</mark> CTTTTCA TATTTATCCAAA CAGTA AAAATAA AATAA AAA TAAGAAAAGAA
18 Gm Gm Allel 2	(301)	IT TATT IT TATCA ARA GGARG TC & CGAA TATCC GT - TI TT TI TT - CT TI TCA TATTT AT CCAAA C& TAAAAA TAAAAAA TAAAAA TAAAAAAAAAA
Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 2	(301)	ITTATTTATTGAAAGAAGAAGTCAGGAATATCCGT-TTTTTTTTTT
		401 500
1-84 Gm Gm Allel 1	(401)	ACAA A T GT CRAAGATT TA GCAAA TTTGCCACAT TTT TCTTA TGAA GT TCTCTT ACTTTCT TTAAT TTCAA T GGAAAT AAT AT TTTAT TTGGT AAG TCCA
1-84 Gm Hm Allel 1	(401)	a caaatgt caaagatt tagcaaa titt gccacat titt to tita tgaag <mark>t to tott</mark> ac titt ot traat titcaa <mark>ti g</mark> gaaataat at tittat tiggt aag tooa
1-30 Gm Gm Allel 1	(401)	a caaat of caas of the cacat the of the transfer of the transfer of the second s
1-45 Gm Gm Allel 1	(401)	acaaa igg caasaa ti tagcaaa ti tigo cacaa ti ti to ti a isaa gi foroti aci ti to ti to ti taa ti caa faataatat ti ta ti isg faasi caa Acaaa isg caasaa ta ta cacaa ti ti to ti ta isaa gi to to ti ta cata a ti taa ti taa ti ta ta ta ta ti ta ti ta
Inra 777 Hm Allel 1	(401)	A CANANGT CANAGATT TAGGAAA TIT GCCACAT TIT TC TTA TGAAGT TOT OT TACT TTC TTAAT TITCAA TC AAATAAT AT TITTAT TIGGT AAG TC CA
Inra 777 Gm Allel 1	(401)	a caaa tigt caaagatt tagcaaa titt gecacat titt tetta tgaag <mark>t tetett</mark> ac titte titaat tieaa t <mark>ts</mark> gaaataatat tittat tiggtaag teea
1-84 Gm Gm Allel 2	(400)	<mark>a caaatgt caaagatt tagcaaa titig ccacat titit ctta tgaagtacttit cititaat ticaa to<mark>g</mark>a<mark>aataatat titiat tiggt aag toca</mark></mark>
1-30 Gm Gm Allel 2	(400)	<mark>a caaat ge caa agate tagca aa tee ge cacatete tee ta tgaa ge</mark> <mark>actee cetta at tecaatco</mark> a <mark>a cataat at tee at tege aage coa</mark>
18 Gm Gm Allel 2	(399)	AC A A TOFCAA AGATTTACCAAA TITTGCCACAATTTTTCTTA TOGAAGI ACTITTCTTTAATTICAA TOGAAAATAATAATATTTTAT TIGGTAAGICCA
Inra 777 Hm Allel 2	(399)	acaaatgicaaagatttagcaaatttgccacatttttcttatgaagtactttctttaatttcaat <mark>gs</mark> aaataatattttatttggtaagtcca
		501 600
1-84 Gm Gm Allel 1	(501)	CTCACTAA GAAGTTTCCTTGAAAAGATTCAAGATTTTAGGGTGTCCACCAAACTATTGGAT <mark>A</mark> TCTGGAAGGCCTTATCCTCTATAAAGAGCATATTTCAGA
1-84 Gm Hm Allel 1	(501)	CTCACTAA GAAGTTTCCTTGA AAGATTCAAGATTTTAGGGTGTCCACCAAACTATTGGAT <mark>A</mark> TCTGGAAGGCCTTATCCTCTATAAAGAGCATATTTCAGA
1-30 Gm Gm Allel 1	(501)	CTCA CTA AGA GTTTCCTTGA A GATTCA AGATTTTA GGGTGTCC ACCAA ACTATTGGATATCTGGAGGCCTTA TCTTCATA A GA GCATTTTCAGA
18 Gm Hm Allel 1	(501)	CTCACTRA GAAGTTCCCTGA AAGATTCAAGATTTAGGGTGTCCACCAAACTATTGGATCCTGGAAGGCCTTATCCTCATAAAGAGCATATTTCAGA
Inra 777 Hm Allel 1	(501)	CTCACTAAGAAGTTTCCTTGAAAGATTCAAGATTTTAGGGTGTCCACCAAACTATTGGAT <mark>A</mark> TCTGGAAGGCCTTATCCTCTATAAAGAGCCATATTTCAGA
Inra 777 Gm Allel 1	(501)	CTCACTAAGAAGTTTCCTTGAAAGATTCAAGATTTTAGGGTGTCCACCAAACTATTGGAT <mark>A</mark> TCTGGAAGGCCTTATCCTCTATAAAGAGACATATTTCAGA
1-84 Gm Gm Allel 2	(494)	CTCRCTARGAGETTCCCTTGAAAGETTCRGGGGTGCCCCCAACCATATTGGATGCCTGGAAGGCCTTATCCTCTATAAAGAGCATATTTCAGA
18 Gm Gm Allel 2	(493)	TCACTAA GAAGTTTCCTTCA AAGATTTAAGATTTTAGGATGCCACCAA ACTATTGCATCGAAGGCCTTA TCCTCTATAAAGAGCATA TTTCAGA
Inra 777 Gm Allel 2	(493)	CTCACTAAGAA GTTTCCTTGAAAGAT TCAAGATTTTAGGGTGTCCACCAAACTAT TGGATG <mark>TCTGGAAGGCCTTA TCCTCTATAAAGAGCATA TTTCAGA</mark>
inra 777 Hm Allel 2	(493)	CTCACTARGAAGTTTCCTTGRAAGATTCAAGATTTTAGOGTGTCCACCARACTATTGGATG <mark>I</mark> CTGGRAGGCCTTATCCTCTATRAAGAGCATATTTCRGA
		988
1-04 (7 (7)))	(001)	901
1-84 Gm Hm Allel 1	(901)	CTARACCOCCCCCT TTCGATCICGACGTCCCCGAGATCCCCGGAGATCGCGGAGATCCCCCCCC
1-30 Gm Gm Allel 1	(901)	CTAAAC GCGGCGI TTI GA TGAT CTGAGATT CTGAGACATT GA GAAAA IG TCG TC 19C GCAAT AC GGAAG OGCAG GGT 1GA AA GAG GA ACT CA CCG TG OG
1-45 Gm Gm Allel 1	(901)	CTARACCCCCCTTTCATTCATCAACGAATTCCAAACATTCAGAAAATCCCCTCCCCAATACCGAAGCCAGGTTGAAAGAC <mark>AACTC</mark> ACCCTCCC
18 Gm Hm Allel 1	(901)	CTAAACGCGCCGTTTTGATCGATCGAGATCCGAAACATTGAGAAAATGTCGTCTGCGCAATACGGAAGGCCAGGGTTGAAAGAG-AACTCACCGTGGS
inra 777 Hm Allel 1	(901)	CTARACUSCUCUTITICA TIGATCIGAGATCIGAAACATTGAGAAACATGGGTCGCCAATACGGAAGOCCAGGGTCGAAACAG
1-84 Gm Gm Allel 1	(901)	CTARACCORDENTITICATICATICATICATICATICATICATICATICATI
1-30 Gm Gm Allel 2	(893)	CTARACCOCCCCT TTI GA TIGAT CIGAGATI CIGAAACATI GA GAAA TOTOGI CIGCCAATAC GGA AGOC AGOCT TGA AAAGA ACTICA CONTOO
18 Gm Gm Allel 2	(892)	CTAAACGCGGCGT TTTGATTGATGTGAGATTCTGAAACATTGAGAAAATGTGGTCTGCGCAATACGGAAGCGCAGGSTTGAAAGAG-AACTCACGGTGG
Inra 777 Gm Allel 2	(892)	CTARACGCGGCGTTTTGATCGATCTGAGATTCTGAGACATTGAGAAAATGTCGTCTGCGCAATACGGAAGCGCAGGGTTGAAAGAG-AACTCACCGTGCG
Inra 777 Hm Allel 2	(892)	CTAAACGCGGCGTTTTGATCGACGAGATTCTGAAACATTGAGAAAATGTCGTCTGCGCAATACGGAAGCGCAGGGTTGAAAGAG <mark>-</mark> AACTCACCGTGGG
		1001 1037
1-84 Gm Gm Allel 1	(1001)	GACCOST GATGAGAAGAAGSTCATASCTGTTTCCTG
1-84 Gm Hm Allel 1	(1001)	GACCGGTIGATGAGAAGAGGAGGAGGTCATAGCTGTTCCTG
1-30 Gm Gm Allel 1	(1001)	GASCOSTICATOAGAAGAAGAISTICATAGOTISTICOTG
18 Gm Hm Allel 1	(1001)	
Inra 777 Hm Allel 1	(1000)	GACCOSTI GATGAGRAGAAGSTCATAGCIGI TICCIG
Inra 777 Gm Allel 1	(1000)	SAGCGSTTGATGAGAAGAAGSTCATAGCTGTTTCCTG
1-84 Gm Gm Allel 2	(993)	SAGCGGTTGATGAGAAGAAGGTCATAGCTGTTTCCTG
1-30 Gm Gm Allel 2	(993)	GAGE GETTEATEA GAAGAAGETEATAGETETTEETE
18 Gm Gm Allel 2	(991)	GABOGG TIGATGAGAAGAAGATGATGACINTTTCCTG
Inra /// Gm Allel 2 Inra 777 Wm Allel 2	(991)	

Abbildung 30: Sequenzausschnitt des mutmaßlichen Promotorbereiches des Kandidatengens bZiP im Probensatz der lockerbeerigen Klone (grün) im Vergleich zu den kompakten Klonen (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). qRT PCR gegenüber den Grundsätzlich weist die 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 ± 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).

Arbeit wurden differentiell exprimierte In der vorliegenden Microarray Genexpressionsdaten ausgewählten von sechs Genen, die als Transkriptionsfaktoren agieren und 14 ausgewählten Kandidatengenen, deren molekulare Funktion nicht bekannt ist, unter Verwendung der gRT PCR untersucht. Bei den Transkriptionsfaktoren konnten bei fünf von sechs Genen (83%) die Microarray Ergebnisse mittel gRT 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 gRT 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 Zellgröβe 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.

Hößelbarth (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 Hößelbarth (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 – Blattachseln 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 gRT PCR konnten für SPS deutliche Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Klongruppen 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 herrunterreguliert. 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 Hößelbarth (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 verschiede Faktoren beeinflusst werden, wie z.B. die Beerengröße, die Beerenanzahl, den Verrieselungsgrad, die Längen der Hauptund 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 Kandidatengenen 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 Versuchjahre 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 Kandidatengenen, 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 Klonen 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 Klonen.

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 diazobenzyloxymethly-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
- Baillod M, Baggiolini 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, Gillesie JW, Faig MJ, Hewitt SM, Phillips JL, Krizman DB, Tangrea MA, Ahram M, Lineham WM, Knezevic V, Ermmert-Buck MR (2002) Post analysis follow up and validation of microaeeay 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 rebparasit 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: realtime monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 11: 1026-1030
- Hod Y (1992) A simplified ribonuclease protection assay. Biotechniques 163: 852-854

- Hößelbarth 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 Libaries 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 cytilogical 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. <u>ISBN 3-515-08382-0</u> (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 heterotrimmeric 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^{ΔΔCT} method. Methods **25**: 402-408
- Lockhart DJ, Dong H, Byme 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) Phänologhische 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 al lateral positions. Plant Journal25: 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
- **PfaffI 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, Schalon 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. USA96: 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 seperated 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 putitative receptor protein kinase with extracellular leucine rich repeats. Plant Cell. 8: 735-746
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Pappe 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 prinicples 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 differentielly 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	IAGCATTTCCAATTCACTTCACGACCTTGGAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Arbane	(1)	ATTCACCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	IAGCATTTCCAATTCACTTCACGACCTTGGAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Päuschling	(1)		атсасттсатос
Readering	(1)		ATCAST I CAST
BIACK ROSE	(1)		
1-84 Gm Gm	(1)	ATTCACCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	TAGCATTTCCAATTCACTTCACGACCTTGGAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
1-84 Gm Hm	(1)	ATTCACCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	IAGCATTICCAATTCACTICACGACCIIGGAATGAGCAGIIGCIITAICAGIIICAIGGC
M242 Hm	(1)	ATTCACCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	IAGCATTTCCAATTCACTTCACGACCTTGGAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
1-30 Gm Gm	(1)	GG	ragcatttccaattcacttcacgaccttggaatgagcagttgctttatcagtttcatggc
1-45 Gm Gm	iń		TCCAATTCACTTCACGACCTTGGAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Müller Thursen	(1)	CCTCCAACAATAACCAACAACACCA	
Musicateller	(1)		INGGATTICGARTICACTICACCACCTICGARTGACCACTICCTITATCACTICATOC
Muskateller	(1)	CAUCAIGUIUUIUUAAGAAAIAAUUAAUAAUAUIAGG	IAGCATTICCAATTCACTTCACGACCTTGGAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Riesling	(1)	CAACACTAGG	IAGCATTTCCAATTCACTTCACGACCTTGGAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Dunkelfelder	(1)	TCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	FAGCATTTCCAATTCACTTCACGACCTTGGAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Traminer rot	(1)		AGCATTTCCAATTCACTTCACGACCTTGGAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Silvaner	(1)	ATTCACCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	ragcatttccaattcacttcacgaccttggaatgagcagttgctttatcagtttcatggc
Grauburgunder	(1)		IAGCATTTCCAATTCACTTCACGACCTTGGAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Schwarzriegling	(1)		CTTCCTTTATCACTTCATCCC
Delene	(1)		01100111At0A01110A1000
Dakapo	(1)		
St. Laurent	(1)		
18 Gm Gm	(1)		
18 Gm Hm	(1)		
Inra 777 Gm	(1)		
54 Gm Gm	in		
01 011 010	(-/		
		101	200
Harslevelue	(85)	AGAGGATGAGCAUTGGAGU <mark>TTTCCTCTTGACAACACTTTAC</mark>	LUIGGAAAGU <mark>G</mark> GAGAGTGGATACUGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTO <mark>C</mark> CCACTTTT
Arbane	(101)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGACACACTTTAC	CTGGAAAGC <mark>G</mark> GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTC <mark>C</mark> CCACTTT <mark>C</mark>
Räuschling	(15)	AGAGGATGAGCACTGGAGC <mark>TTTCCTCTTGA</mark> C <mark>AACACTTTAC</mark>	CTGGAAAGC <mark>G</mark> GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTC <mark>C</mark> CCACTTT <mark>C</mark>
Black Rose	(4)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGATAACACTTTAC	CTGGAAAGC <mark>T</mark> GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTC <mark>T</mark> CCACTTT <mark>C</mark>
1-84 Gm Gm	(101)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGACAACACTTTAC	CTGGAAAGC <mark>G</mark> GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCCACTTTC
1-94 Cm Hm	(101)	ACACCATCACCACTCCACTTCCTCTTCACACACTTTAC	
1-04 Giu Iliu	(101)		
M242 Hm	(101)		
1-30 Gm Gm	(63)	AGAGGATGAGCACTGGAGC <mark>TTTCCTCTTGA</mark> CACACTTTAC	CTGGAAAGC <mark>G</mark> GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTO <mark>C</mark> CCACTTTI <mark>C</mark>
1-45 Gm Gm	(54)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGACAACACTTTAC	CTGGAAAGC <mark>G</mark> GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTC <mark>C</mark> CCACTTT <mark>C</mark>
Müller-Thurgau	(89)	AGAGGATGAGCACTGGAGC <mark>TTTCCTCTTGA</mark> CACACTTTAC	CTGGAAAGC <mark>G</mark> GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTC <mark>C</mark> CCACTTT <mark>C</mark>
Muskateller	(98)	AGAGGATGAGCACTGGAGC <mark>TTTCCTCTTGA</mark> CAACACTTTAC	CTGGAAAGC <mark>G</mark> GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTCCCCACTTTT
Riesling	(71)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGACAACACTTTAC	CTGGAAAGC <mark>GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTO</mark> CCACTTT <mark>C</mark>
Dupkelfelder	(00)	ACACCATCACCACTCCACCTTCCTCTCACAACACTTTAC	CTCCAAACC CACACTCCATACCCCTAATCCATCATAAATACAAACTTC
Duitkerrerder	(50)		
Iraminer rot	(60)	AGAGGAIGAGUAUIGGAGUIIICUIUIIGAUAAUAUIIIAU	CIGGAAAGO <mark>G</mark> GAGAGIGGAIACCGGIAAICCAIGAIAAAIAGAAACIIOCCCACIIIIC
Silvaner	(101)	AGAGGATGAGCACTGGAGC <mark>TTTCCTCTTGA</mark> CACACTTTAC	CCTGGAAAGC <mark>G</mark> GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTC <mark>C</mark> CCACTTTI <mark>C</mark>
Grauburgunder	(61)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGACACACTTTAC	CTGGAAAGC <mark>G</mark> GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTC <mark>C</mark> CCACTTT <mark>C</mark>
Schwarzriesling	(23)	AGAGGATGAGCACTGGAGC <mark>TTTCCTCTTGA</mark> C <mark>AACACTTTAC</mark>	CCTGGAAAGC <mark>G</mark> GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTC <mark>C</mark> CCACTTT <mark>C</mark>
Dakapo	(1)	<mark>ATGAGCACTGGAGC</mark> TTTCCTCTTGACAACACTTTAC	CTGGAAAGC <mark>G</mark> GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTC <mark>C</mark> CCACTTT <mark>C</mark>
St. Laurent	- 11	<mark>ATGAGCACTGGAGC</mark> TTTCCTCTTGACACACTTTAC	CTGGAAAGC <mark>GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTO</mark> CCACTTT <mark>C</mark>
18 Gm Gm	(1)	TTTCCTCTCA AND CACTTAN	CTGGAAAGC GAGAGTGGATAACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTO
10 Gm Um	(1)		
18 GM HM	(1)		
inra /// Gm	(1)	BGAIGAGCACIGGAGCIIICUICIIGACACACIIIAC	CIGGAAAGO <mark>G</mark> GAGAGIGGAIACCGGIAAICCAIGAIAAAIAGAAACIIOCCCACIIIIC
54 Gm Gm	(1)	<mark>ATGAGCACTGGAGC</mark> TTTCCTCTTGA <mark>C</mark> AACACTTTAC	CCTGGAAAGC <mark>G</mark> GAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAATAGAAACTTC <mark>C</mark> CCACTTT <mark>IC</mark>
		201	300
Harslevelue	(185)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATCTTCTCGAGAAAACACCAGTTGAAAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Arbana	(201)	TGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CONTOC TOTO CARA A A A A A A A A A A A A A A A A A
Dämachliss	(201)	TGG1CTGG1GGTG1TCTCTCTCTCTCTCCTCCCCCCTTTCCTCCCCCCTTTCCTCT	CONTRACTOR CONTRA
Rauschiing	(115)		CCATCOTOTO BAGAAAACACCAGI I GAAAATTATCCACTGAAGCAACIGICACIIGICAC
Black Rose	(104)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATC <mark>C</mark> TCTAGAGAAAACACCAGTTGGAAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
1-84 Gm Gm	(201)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATC <mark>TCT<mark>G</mark>GAGAAAACACCAGTTG<mark>A</mark>AAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA</mark>
1-84 Gm Hm	(201)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATC <mark>TCTC</mark> GAGAAAACACCAGTTG <mark>A</mark> AAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
M242 Hm	(201)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATCTTCT <mark>G</mark> GAGAAAACACCAGTTG <mark>A</mark> AAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
1-30 Gm Gm	(163)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATCT <mark>TCT</mark> GAGAAAACACCAGTTG <mark>A</mark> AAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
1-45 Gm Gm	(154)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATCTTCTCGAGAAAACACCAGTTGAAAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Müller-Thurgau	(189)	CGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATCTTCTCCACAAAAACACCACTTCAAACCACTCAACCAACCAACTCACTTCTCCA
Mugicatol lar	(100)	CCACTCCACCTCATCTTCTCATCTTCCTCCCCCCTATACAT	CONTENT CACA A A A CACCA CITICA A A ATTA TOCA CICA A COA A CICICA CITICA
muskateller	(198)		CCATCI TCTOBAGAAAACACCACTIGAAAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Riesling	(171)	GGAUIGGAGGIGATUTUTUTUTUTUTUTUTUTUTUTUTUTUTUTUTUTUTU	UUATU <mark>UTUTU</mark> GAGAAAACAUUAGTTG <mark>A</mark> AAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Dunkelfelder	(190)	GGAUTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATO <mark>TTUTUG</mark> AGAAAACACCAGTTG <mark>A</mark> AAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Traminer rot	(160)	TGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATC <mark>CTCTG</mark> GAGAAAACACCAGTTG <mark>A</mark> AAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Silvaner	(201)	TGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATC <mark>C</mark> TCT <mark>G</mark> GAGAAAACACCAGTTG <mark>A</mark> AAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Grauburgunder	(161)	TGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATC <mark>CTCTC</mark> GAGAAAACACCAGTTG <mark>A</mark> AAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Schwarzriesling	(123)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATCCTCTCGGAGAAAACACCAGTTGAAAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
Dakano	(96)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	CCATCCTCTCGGAGAAAACACCAGTTGAAAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
St Tauxart	(06)	GGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTCCTCCCCTATAGAT	CONTRACTOR CACADA A A CACCACITOR A A A ATTATCCACITOR CONTRACTOR CITICACITOR CACADA A CACCACITOR CACADA A A A TTATCCACITOR A CONTRACTOR CITICACITOR CACADA A CACADA A A A TTATCCA CITICACITOR CONTRACTOR CONT
Ju. Laurent	(90)		CONTOCIOUS CARANACACIA CINERA A A ATTATOCIA CIGA ACCACIGICACI GIULA
18 Gm Gm	(82)		CCATCETETESBAGAAAACACCAGTTGAAAATTATCCACTGAAGCAACTGTCACTTGTCCA
18 Gm Hm	(94)	GGACIGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	ULAIU <mark>IIIIG</mark> AGAAAAUAUCAGIIG <mark>A</mark> AAAITAIUUAUIGAAGUAACIGICACIIGICCA
	()		
Inra 777 Gm	(98)	CGGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCTATAGAT	ccatc <mark>ctctg</mark> gagaaaacaccagttg <mark>a</mark> aaattatccactgaagcaactgtcacttgtcca

		301 400
Harslevelue	(285)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCCGGATTGGTGGTTTTGGAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGAACATGGGGCAT <mark>G</mark> ATAGCAA
Arbane	(301)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCGGATTGGTGGTTTGGAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCAT
Rauschling	(215)	Genard Freedung Carlow and Correct and Cor
1-84 Gm Gm	(301)	CGGAAGTICGAGCACCAGCATACCCCGATTGGTGGTTTGGAGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTGACATTGGTGGCATGAGCAGGGAGGG
1-84 Gm Hm	(301)	CGGRAGTTCGAGCACCAGCATACCCGGATTGGTGGTTTTGGAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATAATAGCAA
M242 Hm	(301)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCCGGATTGGTGGTTTTGGAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATGGTAGAA
1-30 Gm Gm	(263)	CGGAAGTICGAGCACCASCATACCCGGATIGGIGGITITIGGATATAGGTITGAGAGTITGATGGGTGTGCAGGGTGTAGACATGGGGCAT SCADA CTICGACCACCASCATACCCGGATIGGIGGITITGGAATATAGGTITGAGACTITGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATGATAGCA
1-45 Gm Gm Müller-Thurgau	(254)	C GGARGTT CGAGCACCAGCATACCC GGATT GGTGGTTT TGGAGGTTT GGAGGGTT TGGAGGGTGTGCAAGGTGTAGGCATGGGGCATAATAGCAA
Muskateller	(298)	CGGAAGTTCGAGGACCAGCATACCCGGATTGGTGGTTTTGGAGATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATGATAGCAG
Riesling	(271)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCGGATTGGTGGTTTTGGAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCAT <mark>A</mark> ATAGCAA
Dunkelfelder	(290)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCGGATTGGTGGTTTTGGAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGGCAT <mark>A</mark> ATAGCAA
Traminer rot	(260)	CGGAAGTTCGAGGACCAGCATACCCGGATTGGTGGTTTTGGAGTTTGAGAGTTTGATGGGTGTGGCAAGTGTAGACATGGGGCGTAATAGCAB
Grauburgunder	(301)	GGAAGII GACACCAGCALAGUUGGAI IGGIGGII IGGAALAIAGGII GAAGAGII IGA GGOIGI GCAAGGIGI GAGAAGIGGGCALAAIAGCAA GGAAGTI GACCACCAGCATAGCAGAGTI GAGATTAGAGATTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
Schwarzriesling	(223)	CGGAAGTTCGACCACCAGCATACCCGGATTGGTGGTTTTGGAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATGATAGCAA
Dakapo	(196)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCGGATTGGTGTTTTGGAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATG
St. Laurent	(196)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCGGATTGGTGGTTTTGGAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCAT <mark>G</mark> ATAGCAA
18 Gm Gm 19 Gm Um	(182)	CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCGGATTGGTGGTTTTGGAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGGTGTGGAAGGTGTAGACATGGGGGCATGATAGCAA
In Gm Hm Inra 777 Gm	(194)	CORAGIT CRACKCLARCCCOGATIOGTATIONALITAGETIGARAMAAN CRAARTCRACCCCRCATACCCCRCATACCCRCATTRATAGETTIGARAGETTIGARGCATGTACAAGETAGACATGTACCCACGTGTACCCACGTGTACCCACGTGTACCC
54 Gm Gm	(196)	CSGAAGTTCGASCACCAGCATACCCGGATTGGTGTTTTGGAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATAATAGCAA
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
	(205)	
Arbane	(305)	A DIGGIGAGA IGAGIGA RA IGAGIGIA AA IGGUI IGAGA GAGIGAA AGGIGAA AA AGIGGGGGGA GAGA GAGUIGA IGGUAA IGGUAA IGGUA I GEGGGGAGA GAGUGA BA BA TAGA GABA BA TAGUCTA TAGA GABA GAGUA TA BA TA TAGA GAGUAGA TAGA CIGIGA GAGUAGA GAGUAGA G
Räuschling	(315)	GETGGTGAGATGAGGTGATAATGAGTGTAAATAGGCTTAGAGAGAAAGGTGAATAAATA
Black Rose	(304)	G <mark>GTGGTGAGATGAGGTGATAATGAGTGTAAATAGGCTTAGAGAGAAAGGTGAATAAATA</mark>
1-84 Gm Gm	(401)	<mark>a</mark> stgetgagatgaggtgataatgagtgtaaataggettagagagag
1-84 Gm Hm	(401)	RUTGGU GAGATGAGGTGATAATGAGTGTAAATAGGCTTAAGTAGGTGAATGAGGGGAGTGAATGGTGGGGGGAGTAGACTGTTGACAATGGGTGGATATGATGA
1-30 Gm Gm	(401)	no to to any log to a last satisfy and lager t lager by a construction and the store of GGS GASTAGAC TO TACARTGGTATCATA GAST
1-45 Gm Gm	(354)	A GTGGTGAGATGAGGTGATAATGAGTGTAAATAGGCTTAGAGAGAAAGGTGAATAAATA
Müller-Thurgau	(389)	A STGGTGAGATGAGGTGATAATGAGTGTAAATAGGCTTAGAGAGAAAGGTGAATAAATA
Muskateller	(398)	<mark>a</mark> stgetgagatgagetgataatgagtgtaaataggettagagagaaaggtgaataaata
Riesling	(371)	AGTGGTGAGATGAGGTGATAATGAGTGTAAATAGGCTTAAGTAGGTGAATAGGTGAGTGA
Dunkelfelder Traminer set	(390)	Buiggi gaga pang iga laatan gatel aaalagee li abaragaaang gaalataata tagetggggga tagaetti tageaang gababaan ga Catgetgega tagata bataga talata taget ta baget ta bara bababa gada tababat tagetggga stad cotsta aa tageta tage
Silvaner	(401)	GIGEIGAGATGAGCIGATARIGAGUTAARIAGCUTAARIAGCIGAARAGU AMALATAGUTGGUGGAGUTAACUUT DACATUGGUTGIGI AUGUT
Grauburgunder	(361)	R STGGTGAGATGAGGTGATAATGAGTGTAAATAGGCTTAGAGAGAAAGGTGAATAAATA
Schwarzriesling	(323)	<mark>a</mark> stggtgagatgaggtgataatgagtgtaaataggcttagagagaaaggtgaataaata
Dakapo	(296)	A <mark>STGGTGAGATGAGGTGATAATGAGTGTAAATAGGCTTAGAGAGAAGGTGAATAAATA</mark>
St. Laurent	(296)	A GIGGIGAGA IGAGGIGAATAA IGAGIGIAAATAGGCITAGAGAGAAAGGIGGAATAAATAIGGIGGGGAGIAGACIGITGACAATGGGIATIATATGAGI Digogiga ay
18 Gm Hm	(202)	AD I GOI GAGA I GAGO I GALARI DA LA I GAGO I GALARIA GALAGA GAGA GAGA GAGA GAGA GAGA GAGA
Inra 777 Gm	(298)	A GTGGTGAGATGAGGTGATAATGAGTGTAAATAGGCTTAGAGAGAAAGGTGAATAAATA
54 Gm Gm	(296)	A STGSTGAGATGAGGTGATAATGAGTGTAAATAGGCTTAGAGAGAAAGGTGAATAAATA
		501 600
Harslevelue	(485)	501 CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGTGGGGTGGGGTGGATTA <mark>GTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGGGGTGGTGT</mark>
Harslevelue Arbane	(485) (501)	501 CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGTGGGGTGGGGTTA <mark>GTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTGT CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGTGGTGTGGGGTGGATTA<mark>GTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTGT</mark></mark>
Harslevelue Arbane Räuschling	(485) (501) (415)	501 CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGGCATGATGTGGGGTGGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGTGGGGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGTGGGGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGTGGGGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose	(485) (501) (415) (404)	501 CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGGGTGGGT
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Hm 1-84 Gm Hm	(485) (501) (415) (404) (501) (501)	501 CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGTGGGGGGGG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (501)	501 CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGTGGGGTGGATTA <mark>GTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTGT</mark> CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTA <mark>GTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTGT</mark> CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTA <mark>GTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTGT</mark> CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGGTGGG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Hm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (501) (463)	501 600 CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGGGTGGGT
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (501) (463) (454)	501 600 CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAAGAGACGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGGCATGATGGGGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAAGAGCGTGGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCCAAGTGATGGGCATGATGGGGGGGG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Hm 1-84 Gm Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Wüller-Thurgau	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (501) (463) (454) (489)	501 CTATECCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGTGGGGTGGGT
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (501) (463) (454) (498) (498)	501 600 CTATEGCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATEGCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATEGCCGTGGGTATGGTGAGAGTGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATEGCCGTGGGTATGGTGAGAGTGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGGGGGGGG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Hm 1-84 Gm Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (489) (498) (471) (490)	501 600 CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGGTGGG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (454) (498) (471) (490) (460)	501 600 CTATEGCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGGTGGTGGGGGGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAGTGGATGGGCATGATGGGGGGGG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (450) (454) (489) (471) (490) (460) (501)	501 600 CTATGCCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGGAGCGTGGTG CTATGCCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGGGGG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Genevender	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (488) (498) (471) (490) (460) (501) (461)	501 600 CTATECCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGGGTGGGT
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Schwarzziesling Dabaoo	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (488) (471) (489) (498) (471) (460) (460) (501) (461) (423) (396)	501 600 CTATECCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGTGTGTG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent	(485) (501) (415) (501) (501) (501) (463) (489) (498) (498) (471) (490) (460) (501) (461) (423) (396) (396)	501 600 CTATGCCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGTGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGTGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGGCATGATGGTGTGGGGGGGG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzrieeling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (453) (454) (489) (489) (489) (471) (490) (460) (501) (490) (423) (396) (382)	501 600 CTATEGCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACGAGAGACGAGAGAGA
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Hm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (471) (490) (471) (490) (501) (461) (461) (423) (396) (396) (382) (394)	501 600 CTATEGCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGGTGGG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Schwarzziesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Hm Inra 777 Gm	(485) (501) (404) (501) (501) (403) (454) (489) (471) (490) (461) (490) (461) (423) (396) (396) (398) (398)	501 600 CTATECCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGTGGG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Hm Inra 777 Gm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (498) (498) (498) (498) (490) (460) (460) (460) (423) (396) (396) (394) (396)	501 600 CTATEGCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATEGCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATEGCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTG CTATEGCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGGCGTGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGGTG CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGGTGGG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M-22 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Hm Inra 777 Gm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (448) (471) (489) (498) (471) (460) (501) (460) (501) (460) (501) (423) (396) (396) (396)	501 600 CTATEGCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACCAAGAGAGCGTGGTT CTATGCCCGTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGTGGG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Hm 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (501) (463) (454) (454) (454) (471) (490) (501) (461) (461) (461) (462) (396) (396) (398) (398)	
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (489) (489) (489) (489) (471) (460) (501) (461) (471) (423) (396) (396) (396) (398) (396)	501 500 CTATEGCCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGGGGTGGGT
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzziesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Gm Harslevelue Arbane Räuschling	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (448) (471) (448) (471) (440) (501) (440) (501) (440) (501) (423) (396) (396) (398) (398) (398) (585) (601) (515)	501 600 CTATEGCCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGTGTGGGGTGGGT
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Hm 1nra 777 Gm 54 Gm Gm Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (454) (454) (454) (454) (450) (450) (450) (450) (450) (423) (396) (396) (392) (394) (396) (396) (585) (601) (515) (504)	501 500 CTATEGCCGT GGGTATGGT GAGAGAT GAACT GCAAGT GAT GGGCAT GAT GGGGT GGGT
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Hm 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (454) (454) (454) (454) (454) (454) (454) (451) (460) (501) (423) (396) (396) (396) (585) (601) (504)	501 500 CTATGCCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGGCATGATGGGGGGGG
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzziesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Hm 1-84 Gm Hm	(485) (501) (415) (501) (501) (463) (489) (489) (489) (489) (471) (460) (5461) (471) (461) (423) (396) (396) (396) (396) (396) (585) (601) (515) (504) (601) (601)	501 500 CIATGCCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGGCATGATGGGGTGGGGTGGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTT CTATGCCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGGCATGATGGGGTGGGGTGGGT
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm Miller-Thurgau Muskateller Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-64 Gm Hm M242 Hm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (488) (471) (460) (460) (501) (461) (461) (461) (461) (461) (461) (461) (396) (396) (398) (398) (398) (396) (585) (501) (502) (502) (501) (502) (502) (502) (501) (502)	501 500 CIAIGCCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGGCATGATGGGCTGGGTTGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTT CIAIGCCCTGGGTATGGTGAGAGATGAACTGCAAGTGATGGTGGGCATGATGGGGTGGATTAGTGGGATGACAGTATACAAAGAGAGCGTGGTT CIAIGCCCTGGGTATGGTGAGAGAGAACTGCAAGTGATGGGCAGATGATGGGGTGGGT
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Hm 1-84 Gm Hm 1-30 Gm Gm 1-84 Gm Hm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (498) (471) (460) (460) (460) (460) (461) (423) (396) (396) (396) (396) (396) (396) (585) (601) (501) (601) (601) (553)	501 501 500 500 500 500 500 500 500 500
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Hm 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (454) (454) (454) (454) (454) (460) (501) (460) (382) (396) (382) (396) (396) (396) (396) (585) (601) (501) (601) (601) (563) (554) (584)	
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzrieeling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzrieeling Dakapo St. Laurent 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm	(485) (501) (404) (501) (501) (463) (489) (489) (489) (489) (471) (460) (540) (396) (396) (396) (396) (396) (396) (396) (585) (601) (515) (501) (601) (601) (563) (584) (588)	
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzziesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm 1-84 Gm Gm	(485) (501) (414) (501) (501) (463) (459) (488) (471) (420) (460) (501) (461) (461) (471) (423) (396) (396) (396) (396) (396) (396) (396) (396) (585) (501) (502) (502) (502) (504) (501) (502) (504) (501) (502) (504) (502) (503) (50) (503) (501 600 CIATGCCCGTGGGTAGGTGAGAGAGTGAACTGCAAGTGACAGGGCCGAGTGAGT
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Gm 18 Gm Gm 148 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-85 Gm Gm	(485) (501) (415) (404) (501) (453) (454) (471) (463) (471) (460) (460) (460) (461) (423) (396) (396) (396) (396) (396) (398) (396) (398) (396) (585) (601) (601) (601) (601) (589) (589) (589) (587)	501 500 501 500 501 500 501 500 501 500 501 500 501 500 501 500 501 500 501 500 500 500 500 500 500 500 500
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-84 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Räuschling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (454) (454) (454) (454) (454) (454) (450) (450) (450) (450) (423) (396) (396) (396) (392) (394) (396) (395) (501) (601) (553) (554) (559) (590) (590) (560)	501
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm 1-264 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-85 Gm Gm 1	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (454) (454) (454) (454) (454) (454) (454) (451) (460) (501) (460) (382) (396) (382) (396) (382) (396) (382) (396) (515) (501)	$b_{0} = b_{0} = b_{0$
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Traminer rot Schwarzziesling Dunkelfelder Traminer rot St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-85 Gm Gm Müller-Thurgau Muskteller Traminer rot Silvaner Graburgunder	(485) (501) (414) (501) (501) (463) (454) (488) (488) (471) (490) (460) (541) (490) (461) (423) (396) (396) (396) (396) (396) (398) (396) (501) (502)	501
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Gm 18 Gm Gm 18 Gm Gm 18 Gm Gm 1.84 Gm Gm 1.64 Gm Gm 184 Gm Gm 184 Gm Gm 185 Gm Gm 185 Gm Gm 185 Gm Gm 185 Gm Gm 1.45 Gm Gm Silvaner Grauburgunder Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (453) (454) (470) (460) (460) (498) (498) (498) (498) (490) (460) (501) (490) (501) (501) (501) (501) (501) (524) (585) (501) (502) (502) (504) (501) (502)	
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm 1-84 Gm Hm 1-84 Gm Hm 1-84 Gm Hm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm 1-30 Gm Gm 1-84 Gm Hm 1-30 Gm Gm 1-84 Gm Hm 1-35 Gm Gm Xuller-Thurgau Muskateller Räuschling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (454) (454) (454) (454) (452) (456) (452) (396) (396) (396) (396) (396) (396) (396) (396) (396) (585) (601) (502) (501) (502)	
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Hm Inra 777 Gm 54 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-85 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Gm	(485) (501) (415) (404) (501) (501) (463) (454) (454) (454) (454) (454) (454) (454) (454) (454) (453) (450) (423) (396) (382) (396) (382) (396) (382) (396) (382) (396) (585) (501) (502)	
Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-84 Gm Gm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent 18 Gm Gm 18 Gm Hm Inra 777 Gm Harslevelue Arbane Räuschling Black Rose 1-84 Gm Gm 1-94 Gm Hm M242 Hm 1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm Silvaner Grauburgunder Schwarzriesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Grauburgunder Ba Gm Gm 18 Gm Hm	(485) (501) (415) (501) (501) (501) (463) (489) (489) (489) (480) (471) (420) (461) (423) (396) (396) (396) (396) (396) (396) (396) (398) (396) (585) (601) (501) (501) (601) (601) (554) (554) (554) (557) (550) (560) (560) (523) (496) (496) (482) (498)	

		701 800
Harslevelue	(685)	GAGAGAGTACAGTGATGGGTATGAACAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAAT
Arbane	(701)	GAGAGAGTACAGTGATGGGTATGAACAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAAT
Räuschling	(615)	GAGAGAGTACAGTGATGGGTATGAACAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAAT
Black Rose	(604)	GAGAGATTACAGTGATGGGTATGAACAGCGAAGTGGTGATAGAATAGAATTAAGAATTAAGCATGCAT
1-84 Gm Gm	(701)	GAGAGAGI LA CAGI GA FIGGI A FIGACAACCGAAGI GO FIGA I AGAAL GAGAAAL AAGAAALI AACCATIGCATIG GO LI AGAACGACATIGGI A FIGAAAGGCA GAGAGACTACATIGCATIGA CAACAACCGAACTIGO FIGA I AGAALIGAA FIGAALIAAGAAALI AAGCATIGCATIGCATIGCATIGGI A FIGAAAGGCA
1-04 Gill Hill M242 Hm	(701)	SANAGRATA CASIGAT SOGIAT SANCARCCORTS I SI SATAGANI SANA SANGANI TARCCATGO I TAGIAT SOGACATGO SI TAGANA GOLA T Rabara Gina barras tagan balanga bangangan sangangan sangangan sangangan sangan sangan barras tagan barras taga
1-30 Gm Gm	(663)	GAGAGAGTACAGTATGGATATGACAAGGGAAGTGGTGATGAAGAATGAAATTAAGAATTAAGCATGCAT
1-45 Gm Gm	(654)	GAGAGAGTACAGTGATGGGTATGAACAAGCGAAGTGGTGATGGAATGAAT
Müller-Thurgau	(689)	GAGAGAGTACAGTGATGGGTATGAACAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAAT
Muskateller	(698)	GAGAGAGTACAGTGATGGGTATGAACAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAAT
Riesling	(671)	GAGAGAGTACAGTGATGGGTATGAACAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAAT
Dunkelfelder	(690)	GAAGAGTTACAGTGATGGGTATGAACAACCGAAGTGGTGATAGAATGAAT
Traminer rot	(660)	GAGAGAGTACAGTGATGGGTATGAGCAACGGATGGTGATAGATGAGTAGATTAAGCATGCAT
Grauburgunder	(701)	SANGKATA CASIGAT GOGTAT CARCARCCORTO GOTATAGAN CARA CARA A CARGANATTAR CCATGO ATOTA CARGA CARGA CARGA CARGA CA Carga carga carg
Schwarzriesling	(623)	CACAGAGTACAGTGATGGGTATGACAAGGGAGTGGTGGTGGTGGTGATAGAATGAAT
Dakapo	(586)	
St. Laurent	(596)	GAGAGAGTACAGTGATGGGTATGAACAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAAT
18 Gm Gm	(582)	${\tt GAGAGAGTACAGTGATGGGTATGAACAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAAT$
18 Gm Hm	(461)	
Inra 777 Gm	(598)	GAGAGAGTACAGTGATGGGTATGAACAAGCGAAGTGGTGATAGAATGAAT
54 Gm Gm	(579)	
		801
Harslevelue	(785)	000
Arbane	(801)	GAGTAGAAGAGAAAAGGTGGTGGAGGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAAAT
Räuschling	(715)	GAGTAGA <mark>A</mark> AGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAAA <mark>T</mark>
Black Rose	(704)	GAGTAGA <mark>G</mark> AGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCA
1-84 Gm Gm	(801)	GAGTAGAGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGGGGGGGG
1-84 Gm Hm	(801)	GAGTAGAGAGAAAAGGTGGTGAGGAATAATGAGGAATATGGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGGAGGAAAAGGAAAAGGAGAAAAGG
1-30 Gm Gm	(263)	SACIASA GASA AAAASI GI GA CAAGAALIA TA CAACAAALI GI GGA LACA COI LACAGA LACAACA CAACA CAACA CAACA CAACA CAACA CAACA CAACAA
1-45 Gm Gm	(754)	GASTAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATSTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAAAT
Müller-Thurgau	(789)	GAGTAGA <mark>G</mark> AGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAAAT
Muskateller	(798)	GAGTAGA <mark>G</mark> AGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAAA <mark>T</mark>
Riesling	(771)	GAGTAGA <mark>A</mark> AGAGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAAAT
Dunkelfelder	(790)	GAGTAGAAGGAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGGGCAGCCA
Traminer rot	(760)	GAGTAGAAAGGAAAAGGTGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACGTGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGGATGGCATGGATAGACATGAGGTGTGGGATGGAT
Grauburgunder	(761)	GAD RAGARGARANGARANG DI GU GANGGAR TA TGAGCANGANA TG GGGGT GGATACAT GOTAL GAGAT GAGCAT GAGCU GAGCU GAGCAGCANA
Schwarzriesling	(723)	GAGTAGAAAAGGTAAAAGGTGGTGAAGGAATAATGAGCAAGAAATGTGGGGTTGGATACATGGTATACGGGTTGGATAGACATGAGGTGTGGCAGCCAAAT
Dakapo	(586)	
St. Laurent	(696)	GAGTAG
18 Gm Gm 18 Gm Um	(681)	
In Gal Ana Inra 777 Gm	(401)	
54 Gm Gm	(579)	
		901 974
Harslevelue	(882)	
Arbane	(901)	
Rauschling Black Rose	(801)	
1-84 Gm Gm	(901)	
1-84 Gm Hm	(901)	AGGTTTAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCTTTCAATTTCTTTGGGCTTTCCTTGCATT
M242 Hm	(901)	AGGTTTAACATCCCCAACTCCTCATCTTTGGTTCATGTCTTTCAA
1-30 Gm Gm	(860)	
1-45 Gm Gm	(854)	
Musksteller	(808)	
Riesling	(871)	AGGTTTAACATCCCCAACTCC
Dunkelfelder	(887)	
Traminer rot	(856)	
Silvaner	(901)	AGGTTTAACATCCCCCAACT
Grauburgunder	(860)	
Schwarzriesling	(823)	AGGTTTAACATUUCUCAACTUUTCATCTTTGGTTCATGTCTTTCAATTTCTTTGG
St. Laurert	(386)	
18 Gm Gm	(681)	
18 Gm Hm	(461)	
Inra 777 Gm	(752)	
54 Gm Gm	(579)	





		301 400
Harslevelue	(213)	TTTTTTCTCCCCCCGCTTCCTGTGTCCCCAGTCA TACCC TACGTATTGTCCCT TTTGCCTTCC TTGAA CGAAGGTACAT GGTAC ATGCAAGTAA TTGTTCT
Arbane	(203)	TTTTTTCTCCCCCCGCTTCCTGTGTCCCCCAGTCATACCCTACGTATTGTCCCTTTTGCCTTCCTT
Koshu	(193)	TTTTTCCCCTCCCCTGTCCCCCCGGTCA TACCC TACGTATTCCCCTTTCCCTTCCTTCACGAGGTACATGGTACATGGTACATGGTACATGGTACATGGTACATGGTACATGGTACATGGTACATGGTACATGGTACATGGTACATGGTACATGGTACGTAGGTACATGGTACATGGTACATGGTACATGGTACATGGTACGTAGGTACGTAGGTACATGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTACGTAGGTAG
Black Rose	(197)	TTTTTTCTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
Cardinal	(203)	TITITICTCCCCCCGCTTCCTGIGTCCCCCAGTCA TACCC TACG TATIGTCCCT TITIGCCTTCC TIGAA CGAAGG TACAT GGTACATGCAAGTAA TIGTCT
1-84 Gm Gm	(203)	TTTTTTCTCCCCCGCTTCCTGTGTCCCCAGTCA TACCCTACGTATTGTCCCT TTTGCCTTCCTTGAACGAAGGTACATGGTACATGCAAGTAA TTGTTCT
1-84 Gm Hm	(203)	TTTTTTCTCCCCCGCTTCCTGTGTCCCCAGTCA TACCCTACGTATTGTCCCTTTGCCTTCCTTGAACGAAGGTACAT GGTACATGCAAGTAA TTGTTCT
M242 Hm	(203)	TTTTTTCTCCTCCGCTTCCTGTGTCCCCAGTCA TACCCTACGTATTGTCCCT TTTGCCTTCCTTGAACGAAGGTACAT GGTACATGCAAGTAA TTGTTCT
1-30 Gm Gm	(208)	TTTTTTCCCCCCCGCTTCCCGFIGTCCCCAGTCATACCCTACGTATTGTCCCTTTTGCCTTCCTT
1-45 GM GM	(203)	TITITICICULUS FICULASICA IACCIAUSIA IECULUS INCONCULUS INCACONOGIACAI GUACAIGAAGIAA IIGITUT
Dornfelder	(204)	TTTTTTCCCCCCCCCTCCCGCTCCCCACCAACCCTACCTA
Kerner	(208)	TTTTTTCTCCCCCGCTTCCTGTGTCCCCCAGTCA TACCC TACGTATTGTCCCT TTTGCCTTCC TTGAACGAAGGTACAT GGTACATGCAAGTAA TTGTTCT
Müller-Thurgau	(196)	ITTTTTCTCCCCCGCTTCCTGTGTCCCCAGTCA TACCCTACGTATTGTCCCT ITTGCCTTCC TTGAACGAAGGTACAT GGTACATGCAAGTAA ITGTTCT
Muskateller	(229)	TTTTTTCTCCCCCCGCTTCCTGTGTCCCCAGTCA TACCCTACGTATTGTCCCT TTTGCCTTCCTTGAA CGAAGGTACAT GGTACATGCAAGTAA TTGTTCT
Riesling	(208)	TTTTTTCTCCCCCCGCTTCCTGTGTCCCCAGTCA TACCC TACG TATTGTCCCT TTTGCCTTCC TTGAA CGAAGG TACAT GGTAC ATGCAAGTAA TTGTTCT
Dunkelfelder	(202)	TITITICICCCCCCGCTICCTGTGTCCCCAGTCA TACCCTACG TATTGTCCCT ITTGCCTICCTTGAACGAAGG TACAT GGTACATGCAAGTAATIGTICT
Traminer rot	(238)	TITITICICEIC CONTROL CONTROL A LA CONTROL CONT
Felicia	(198)	TTTTTTCTCCCCTCCCGCTCCCGGCGCGGCGACCAACCCCTACGCGACGCGCCCCCTTCCCCTCCCT
Grauburgunder	(193)	TTTTTTCTCCCCCCGCTTCCTGTGTCCCCAGTCA TACCC TACG TATTGTCCCT TTTGCCTTCC TTGAACGAAGG TACAT GGTAC ATGCAAGTAA TTGTTCT
Schwarzriesling	(194)	TTTTTTCTCCTCCGCTTCCTGTGTCCCCAGTCATACCCTACGTATTGTCCCTTTTGCCTTCCTT
Dakapo	(274)	TTTTTTCTCCCCCGCTTCCTGTGTCCCCAGTCA TACCC TACGTATTGTCCCT TTTGCCTTCC TTGAA CGAAGG TACAT GGTACATGCAAGTAA TTGTT CT
St. Laurent	(193)	TTTTTTCTCCCCCCGCTTCCTGTGTCCCCAGTCA TACCC TACGTATTGTCCCT TTTGCCTTCC TTGAA CGAAGG TACAT GGTACATGCAAGTAA TTGTTCT
Villaris	(201)	TITITICICCCCCCGCTICCTGTGTCCCCAGTCA IACCCIACG TATIGTCCCI ITIGCCTICCI TGAACGAAGGIACAI GGIACAIGCAAGIAAIIGTI CI
18 Gm Gm 10 ~~ V~	(201)	TITITIC TCC CCCCTTCCTEGGTCCCCAGTCATACCCCTACGTATTGTCCCTTTCTTCCCTTCCTT
TNRA 777 Cm	(201)	TTTTTTTCTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
INRA 777 Hm	(196)	TTTTTTCCCCCCCCCTCCCTGGCCCCCCCCTGCCGCCCCCC
54 Gm Gm	(191)	TTTTTTCCCCCCGCTTCCTGTGTCCCCAGTCATACCCTACGTATTGTCCCTTTGCCTTCCTT
Handlevelve	(21.2)	
Arbane	(303)	SCALEGY TRACTOCINE TO TRECARGACITICATION OF THE CART FARMET CARCENER TO A CONTRACT CARDEN AND THE CARDEN AND TH
Koshu	(293)	SCAAGCTITAACTICACTICTTATCATAGACTICGTIGGATCCTTATCCAATTAAATTCACCAGTCGATTTAGCTGCAACATATTCTATCTA
Räuschling	(300)	SCARGETTTARCTTCRETTETTA TCATAGACTT CGTTGGATCCTTAT CCARTTARAT TCRCCRGTGGATTTRGCTGCARCATATTCTATGTARATATTTC
Black Rose	(297)	SCAAGCTTTAACTTCACTTCTTATCATAGACTTCGTTGGATCCTTATCCAATTAAATTCACCAGTCGATTTAGCTGCAACATATTCTATGTAAATATTTC
Cardinal	(303)	GCAAGCTTTAACTTCACTTCTTATCATAGACTTCGTTGGATCCTTATCCAAT TAAATTCACCAGTCGATTTAGCTGCAACATATTCTATGTAAATATTTC
1-84 Gm Gm	(303)	GCAAGCTITAACTICACTICTITATCATAGACTICGTIGGATCCTATTCAATTAAATTCCACCAGTGATTTAGCTGCAACATATTCTATGTAAATATTTC
1-04 Gill Hill M242 Hm	(303)	SCARGETTANETTERETETATETATETATETATETETETETETETTATETANATETETETE
1-30 Gm Gm	(308)	CCARCELLARCE TO A CALL
1-45 Gm Gm	(303)	SCAAGCTTTAACTTCACTTCTTATCATAGACTTCGTTGGATCCTTATCCAATTAAATTCACCAGTCGATTTAGCTGCAACATATTCTATGTAAATATTTC
Regent	(338)	SCAAGCTTTAACTTCACTTCTTATCATAGACTTCGTTGGATCCTTATCCAATTAAATTCACCAGTCGATTTAGCTGCAACATATTCTATGTAAATATTTC
Dornfelder	(304)	GCAAGCTTTAACTTCACTTCTTATCATAGACTTCGTTGGATCCTTATCCAATTAAATTCACCAGTCGATTTAGCTGCAACATATTCTATGTAAATATTTC
Kerner	(308)	CCARCETTRACTICACTECTIATCATAGACTECGITGGATECTTATCCAATTAAATTCACCAGTCGATETIAGCEGCAACATATECTATGTAAATATETE
Muller-Thurgau Muskateller	(296)	GCAAGCH TRACTICACTICTATCATAGACH CGTIGGATCCTTATCCAATTAAATTCACCACTGATTAGCTGCACAATTATTCTATGTAGATATTTC GCAAGCTTTAACTCACTCCTTTATCATAGACH CGTIGGATCCTTATCCCAATTAAATTCACCACTGATTAGCTGCACAATATTCTATGTAGATATTTC
Riesling	(308)	COARCITTAACTTCACTTCTTATCTTAGACTTCGTTGGATCCTTATCCTATTCACCAGTCGATTTACCTGCACCATATTCTTATCTTAGATATTTC
Dunkelfelder	(302)	SCAAGCTTTAACTTCACTTCTTATCATAGACTTCGTTGGATCCTTATCCAATTAAATTCACCAGTCGATTTAGCTGCAACATATTCTATGTAAATATTTC
Traminer rot	(338)	SCAAGCTTTAACTTCACTTCTTATCATAGACTTCGTTGGATCCTTATCCAATTAAATTCACCAGTCGATTTAGCTGCAACATATTCTATGTAAATATTTC
Silvaner	(304)	GCAAGCTTTAACTTCACTTCTTATCATAGACTTCGTTGGATCCTTATCCAATTAAATTCACCAGTCGATTTAGCTGCAACATATTCTATGTAAATATTTC
Felicia	(298)	CCARGETTTAACTICACTICTTATCATAGACTICGTTGGATCCTTATCCAATTAAATTCACCAGTGGATTTAGCTGCAACATATTCTATGTAAATATTTC
Schwarzziegling	(293)	GLAGGETTIACTICALITETICIALGAGETEGITEGITEGITECTIATECAALIAATICACEGIGATTIAGETGGAAGAALATICIALGAAALATITE GCAAGGETTIACTICACITETITETIA TEATA TEATA TATATATECCAATICACE AGTICALTIAGETGGAACAALATICIALGAAALATITE
Dakapo	(374)	COARCTITAACTTCACTTCTTATCATAGACTTCGTTGGATCCTTATCCTATTCACCAGTCGATTTACCTGCACCATATTCTTATCATAGATATTTC
St. Laurent	(293)	SCARGCTTTAACTTCACTTCTTATCATAGACTTCGTTGGATCCTTATCCAATTAAATTCACCAGTCGATTTAGCTGCAACATATTCTATGTAAATATTTC
Villaris	(301)	SCAAGCTTTAACTTCACTTCTTATCATAGACTTCGTTGGATCCTTATCCAATTAAATTCACCAGTCGATTTAGCTGCAACATATTCTATGTAAATATTTC
18 Gm Gm	(301)	SCAAGCTTTAACTTCACTTCTTATCATAGACTTCGTTGGATCCTTATCCAATTAAATTCACCAGTCGATTTAGCTGCAACATATTCTATGTAAATATTTC
18 Gm Hm	(301)	CCARGETTIAACTICACTICATAGACTICGTIGGATCCTATICCAATTAAATTCACCAGTGATTTAGCTGCAACATATICTATGTAAATATTT
INRA 777 Hm	(296)	SCARGETTARCTECRETERIERING AND THE GATE CONTRACTOR AND AND TRACEDUCER AND THE CONTRACTOR AND AND THE TOTAL T
54 Gm Gm	(291)	SCARGCTITAACTICACTICITATCATAGACTICGTIGGATCCITATCCAATTAAATTICACCAGTCGATTAGCTGCAACATATTICTATGTAAATATTITC
		501 600
Harslevelue	(413)	TTCTCTAATGTGTTACTAATTATATATAGAGCAAAATTCTGAAGACATCATGTTCGATCATTTTCATTATCCTAATCATATTATGTTTTCTCGTACCACTA
Arbane	(403)	IT CICIDATGIGITACIDATIDATATTAGAGCADADATICIGAD GACAT CATGITCGAT CATTITCATTATCCTADATCATATTATGITTTCCCGTACCACIDA
Koshu	(393)	I LULIAI GIGI I AUTATTAT ATTAGAGCAA AATTC IGAA GACATCATCI TIGAT CATTTI TCATTATCCTAATCAT ATTATCTTTT CTCGTACCAC A I TCTCTA NGCTTTTI CINITATA I TTAGAGCAA AATTC IGAA GACATCATCATTATGAT CATTATCCTAATCAT ATTATGTTTT CTCGTACCAC AA
Rauschling	(400)	TECETARI OF TRANSPORTED AND AND AND AND AND AND AND AND AND AN
Cardinal	(403)	TCCCTRATEGETRACTAATATATATAGAGCAAAATTC TGAAGACAT CATGI TCGAT CATTI TCATT ATCCTAATCATATTAT GTTTT CTCGT ACCAC TA
1-84 Gm Gm	(403)	TTCTCTAATGTGTTACTAATTATATAGAGCAAAATTCTGAAGACATCATGTTCGATCATTTTCATTATCCTAATCATATTATGTTTTCTCGTACCACTA
1-84 Gm Hm	(403)	TTCTCTAATGTGTTACTAATTATATAGAGCAAAATTCTGAAGACATCATGTTCGATCATTTTCATTATCCTAATCATATTATGTTTTCTCGTACCACTA
M242 Hm	(403)	TTCTCTAATGTGTTACTAATTATATATAGAGCAAAATTCTGAAGACATCATGTTCGATCATTTTCATTATCCTAATCATATTATGTTTTCTCGTACCACTA
1-30 Gm Gm	(408)	TEETCTAATGETETACTAATTATATATAGAGCAAAATTEEGAAGACATCATGETEGATCATTETCATTATECTAATCATATTATGETTTEEGGACCACTA
1-45 GM GM	(403)	TECTEDATEGETACIAATIATATATATAGACAAAATECEGAAGAATCATGATGATCATTATCATATCA
Dornfelder	(404)	TTCTCTAATGFGTTACTAATTATATTAGAGGAAAATTC TGAAGACATCATGTTCGATCATTTTCATTATCTTATC
Kerner	(408)	TTCTCTAATGTGTTACTAATTATATTAGAGCAAAATTC TGAAGACAT CATGT TCGAT CATTT TCATTATCCTAATCATATTATGTTTT CTCGT ACCAC TA
Müller-Thurgau	(396)	TTCTCTAATGTGTTACTAATTATATAGAGCAAAATTCTGAAGACATCATGTTCGATCATTTTCATTATCCTAATCATATTATGTTTTCTCGTACCACTA
Muskateller	(429)	TTCTCTAATGTGTTACTAATTATATTAGAGCAAAATTCTGAAGACATCATGTTCGATCATTTTCATTATCCTAATCATATTATGTTTTCTCGTACCACTA
Riesling	(408)	ITCICIANISTICIANTIATATIA ATTAGASCANANTIC ISANASCAN CATGITICGAT CATTITICATIATCCTNATCATATIATGITITICICGIACCACIA International and antical antical antical antical and antical antical antical antical antical antical antical a
Dunkeifelder	(402)	TO TO TRADUCT A TRADATIANA HA PAGGAAGATIC TGAGGACAT CATGING CATTI TCATTATCTATATCATATTATGTTTTCCCCACCACTA
Silverer	(404)	TECTORAL GENERAL TRANSPORTATION AND AND A CARACTERISTIC CONTRACT AND A CARACTERISTIC AND A CARACTERISTICS AND A CA
Felicia	(398)	TICTCTAATGTGTTACTAATTAT ATTAGAGCAAAATTCTGAAGACATCATGTTCGATCATTTTCATTATCCTAATCATATTATGTTTTCTCGTACCACTA
Grauburgunder	(393)	TTCTCTAATGTGTTACTAATTAT ATTAGAGCAAAATTC TGAAGACAT CATGT TCGAT CATTT TCATT ATCCTAATCATATTATGTTTT CTCGTACCAC TA
Schwarzriesling	(394)	TTCTCTAATGTGTTACTAATTATATATAGAGCAAAATTCTGAAGACAT CATGTTCGATCATTTTCATTATCCTAATCATATTATGTTTTCTCGTACCACTA
Dakapo	(474)	IT CELEAR GENERAL ATTACATE ATTACAGE A A ATTE EGA GACATE AT GETE GATE ATTE TEAT TATE ATTAT ATTAT GETET CECATE A
St. Laurent	(393)	I LUCI BALGIGI I AUTAATTATATTATATATCAGACAABATTC TGARGACAT CATGATCATTTTCATTATCTATATCATATTATGTTTTCCGTACCACTA
Villaris	(401)	TECTORAL OF OTRACTARTIAL ATTACASCARARTIC COARGACAT CATO TECAT CATO ITTICAT A TECTAAT CATA TALOTTI CTECTA CATA
18 Gm Hm	(401)	TICTICIDATIGICTACTAATIATATTAGAGCAAAATICTGAAGACATCAIGTICGATCATTTTCCTTATACTAATIATATTTTTTCTGTACCACTA
INRA 777 Gm	(396)	TICTCTRATGIGITACTRATTATATAGAGCARAATTCIGAAGACATCATGIICGALCATTITCATTATCCTRATCATATTATGITTTCCCGACCACTA
INRA 777 Hm	(396)	TTCTCTAATGTGTTACTAATTAT ATTAG AGCAA AATTC TGAA GACAT CATGT TCGAT CATTT TCATT ATCCTAATCAT ATTAT GTTTT CTCGTACCACTA
54 Gm Gm	(391)	TTCTCTAATGTGTTACTAATTAT ATTAGAGCAAAATTCTGAA GACAT CATGTTCGAT CATTTTCATTATCCTAATCAT ATTAT GTTTTCTCGT ACCAC TA

		601 700
Harslevelue	(513)	TGTTTCATATGTTTCAACT <mark>A</mark> CCCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATG <mark>R</mark> ATCTTAAAAGGG <mark>R</mark> GTTATGTATTTAAAATTAT
Arbane	(503)	TGTTTCATATGTTTCAACTACCCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATGGATCTTAAAAGGGAGTTATGTATTAAATTAT
Koshu	(493)	TGTTTCATATGTTTCAACTRCCCTAATCACATTATTTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATGGATCTTAAAAGGGRGTTATGTATTAAATTAT
Rauschling	(300)	IGHT CATALOFT CAAC TACCUTATICACATTATITTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Cardinal	(503)	IGHT CATATGTT CAACTACCCTAATCACATT ATTTT TAGCTAT GGGCAGGGAAGATTGACTCCA TGAATCTTAAAAGGGA GTTAT GTATT WAATTAT
1-84 Gm Gm	(503)	TGTTTCATAIGTTTCAACTACCCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATGAATCTTAAAAGGGAGTTATGTATTWAATTAT
1-84 Gm Hm	(503)	TGTTTCATATGTTTCAACT <mark>A</mark> CCCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATG <mark>A</mark> ATCTTAAAAGGG <mark>A</mark> GTTATGTATTWAATTAT
M242 Hm	(503)	TGTTTCATATGTTTCAACT <mark>A</mark> CCCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATG <mark>G</mark> ATCTTAAAAGGG <mark>A</mark> GTTATGTATTWAATTAT
1-30 Gm Gm	(508)	TGTTTCATATGTTTCAACTACCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATG <mark>C</mark> ATCTTAAAAGGG <mark>A</mark> GTTATGTATTWAATTAT
1-45 Gm Gm	(503)	TGTTTCATATGTTTCAACTACCCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATGGATCTTAAAAGGGAGTTATGTATTAAATTAT
Regent	(538)	TGTTTCATATGTTTCAACTACCCTTAATCACATTATTTTTTAACTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATGFATCTTAAAAGGGAGTTATGTATTAAATTAA
Dornieider	(504)	TO THE ALCOUNT OF A CONCENTRATION OF A CONTRACT OF A CONCENTRATION OF A CONCENTRATICA CONCENTRATION OF A CONCENTRATICA
Müller-Thurgeu	(496)	TOTT CALLED TO CALLED CONTRAINED TO TATT TAGE TA TO COCA CALAGATICA COCA TO ATC TANA ACCAL OTTAT CALLED ATT TA
Muskateller	(529)	IGTITICATATIGTITICAACTE COCTAATCACATTATITITIAGCTATIGGGCAGGGAAGATTGACTCCATCATATCAT
Riesling	(508)	TGTTTCATATGTTTCAACTRCCCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATG <mark>C</mark> ATCTTAAAAGGG <mark>G</mark> GTTATGTATTAAAATTAT
Dunkelfelder	(502)	TGTTTCATATGTTTCAACT <mark>A</mark> CCCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATG <mark>A</mark> ATCTTAAAAGGG <mark>R</mark> GTTATGTATTWAATTAT
Traminer rot	(538)	TGTTTCAIATGTTTCAACT <mark>A</mark> CCCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATG <mark>A</mark> ATCTTAAAAGGG <mark>A</mark> GTTATGTATT <mark>A</mark> AATTAT
Silvaner	(504)	TGTTTCATATGTTTCAACTRCCCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATGRATCTTAAAAGGGAGTTATGTATTWAATTAT
Felicia	(498)	TGTTTCATATGTTTCAACTRCCCTAATCACATTATTTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATCG
Grauburgunder	(493)	
Dakapo	(494)	TO TECHNICH TECHNICH ACCURATE ACTIVITIA TO TA TECOCOLOCOMO ATO ATO ACTICA TO ACTIVIA OBJETI OTATI TA TECHNICH ACTIVIA OBJETI OTATI OTATI OTATI TA TECHNICH ACTIVIA OBJETI OTATI
St Laurent	(493)	TOTT CALLED TO CALLED CONTRACT AND TATTE TARGET AT CONCRECT AND A CONTRACT CALLED TO TATA AND A CONTRACT AND A CONTRACT AT A CONTRACT AND A CONTRACT AT A CONTRACT AND A CONTRACT AT A C
Villaris	(501)	TETTICATAIGTTICAACTECCCTAATCACATTATTITTACCTATTGGCCACGGAAGATTGACTCCATGGATCTTAAAAGGGRGTTATGTATTAAATTAT
18 Gm Gm	(501)	TGTTTCATATGTTTCAACTACCCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATGRATCTTAAAAGGGAGTTATGTATTWAATTAT
18 Gm Hm	(501)	TGTTTCATATGTTTCAACT <mark>A</mark> CCCTAATCACATTATTTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATGR <mark>ATCTTAAAAAGGG</mark> AGTTATGTATTWAATTAT
INRA 777 Gm	(496)	TGTTTCATATGTTTCAACT <mark>A</mark> CCCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATG <mark>G</mark> ATCTTAAAAGGG <mark>A</mark> GTTATGTATTTTAATTAT
INRA 777 Hm	(496)	TGTTTCATATGTTTCAACT <mark>A</mark> CCCTAATCACATTATTTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATG <mark>G</mark> ATCTTAAAAGGG <mark>A</mark> GTTATGTATTTAATTAT
54 Gm Gm	(491)	TGTTTCATATGTTTCAACTRCCCTAATCACATTATTTTTAGCTATTGGGCAGCGAAGATTGACTCCATG <mark>G</mark> ATCTTAAAAGGG <mark>A</mark> GTTATGTATTAAATTAT
		701 200
Harslevelue	(613)	CCICATIAATTAGCCCTAGIGIGIGIGACATICITITATICCCCCTATIGIACTI TGCGCATAGAACTIGICAACTICITAATATICATICCTAATATICTCCCCTATIGIACTICCCCATAGAACTICICAACTICICAACTICICAATATICTCCCCATAGAACTICICAACTICICAACTICICAATATICCCCCATAGAACTICICAACTICICAACTICICAATATICCCCCATAGAACTICICAACTICICAACTICICAATATICICCCAATA
Arbane	(603)	CCTCATTAATTAGCCCTAGTGTG TGACA TICTT TTATTCTCCTATTGTACTT TGCGCATAGAACTTGTCAACTTCTAATATTTAGTGCTAATAATTGCTC
Koshu	(593)	CCTCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGTGACATTCTT TTATTCTCCCTATTGTACTTTGCGCATAGAACTTGTCAACT <mark>TCTWATATTTAGTGCTAATAATTGCTC</mark>
Räuschling	(600)	CCTCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGTGACATTCTT TTATT CTCC TATTG TACTT TGCGCATÅG <mark>A</mark> ACTTG TCAACT <mark>TCTAA TATTT AGTGC TAATAATTGCTC</mark>
Black Rose	(597)	CCTCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGACATTCTT TTATTCTCC TATTG TACTT TGCGCATAGAACTTG TCAACT <mark>TCTAA TATTT AGTGC TAATAATTGC TC</mark>
Cardinal	(603)	CCTCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGACATTCTTTTATTCTCCTATTGTACTTTGCGCATAGAACTTGTCAACT <mark>TCTAATATTTAGTGCTAATAATTGCTC</mark>
1-84 Gm Gm	(603)	CCTCATTAATTAGCCCTAGGGGGGGGACATTCTT TTATTCCCC TATTGTACTT GCGCATACAACTTGTCAACTTCTAATATTTAGTGC TAATAATTGC TC
1-84 Gm Hm	(603)	CONCERNMENT ACCOUNTING TO A CONTRACT TO A CONTRACT A CONTRACT AND
1_30 Cm Cm	(603)	
1-45 Gm Gm	(603)	CCTCATTAATTACCCCTACTGCGCGCGACATTCTTTTTTTT
Regent	(638)	CCTCATTAATTASCCCTAGTGTGTGGCATICTI TTATTCTCC TATTGTACTI GCGCATAGAACTIGTCAACTTTTAATATTTAGTGCTAATAATTGCTC
Dornfelder	(604)	CCTCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGACATTCTTTTATTCTCCTATTGTACTTTGCGCATAGAACTTGTCAACTTCTAATATTTAGTGCTAATAATTGCTC
Kerner	(608)	CCTCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGACATTCTT TTATTCTCC TATTGTACTT TGCGCATĂ <mark>S</mark> AACTTGTCAACT <mark>TCTAA TATTT AGTGC TAATAATTGCTC</mark>
Müller-Thurgau	(596)	CCTCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGTGACATTCTT TTATT CTCC TATTGTACTT TGCGCATA <mark>G</mark> AACTTGTCAACT <mark>TCTAA TATTTAGTGCTAATAATTGCTC</mark>
Muskateller	(629)	CCTCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGACATTCTTTTATTCTCCTATTGTACTTTGCGCATA <mark>A</mark> AACTTGTCAACT <mark>TCTAATATTTAGTGCTAATAATTGCTC</mark>
Riesling	(608)	CCICATIAATAGCCCTAGIGIGIGACATICITITATICICCTATIGIACITIGCGCATAGAACTIGICAACITICIAATATITAGIGCIAATAATIGCIC
Dunkeiteider	(602)	CITCATTAATTAACCCTAATAATTAATTAATTAATTAATT
framiner rot	(635)	CONCERT AND ADDRESS OF A DESCRIPTION OF
Felicia	(598)	CONCERTINATION CONTRACTOR CO
Grauburgunder	(593)	COTCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGGCATICTTTTATTCTCCCTATTGTACTTGCGCATAGAACTTGTCAACTTGTCAACTTTAGTGCTAATAATTGCTC
Schwarzriesling	(594)	CCTCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGTGACATTCTT ITATTCTCCCTATTGTACTTGCGCATAGAACTTGTCAACT
Dakapo	(674)	CCTCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGACATTCTT TTATTCTCC TATTG TACTT TGCGC ATAGAACTTG TCAACT <mark>TCTAA TATTT AGTGC TAATAATTGC TC</mark>
St. Laurent	(593)	CCTCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGACATTCTT TTATTCTCC TATTG TACTT TGCGC ATAGAACTTG TCAACT <mark>TCTAA TATTTAGTGC TAATAATTGCTC</mark>
Villaris	(601)	CCTCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGACATTCTT TTATTCTCC TATTGTACTT TGCGCATAGAACTTGTCAACT <mark>TCTAATATTTAGTGC TAATAATTGC TC</mark>
18 Gm Gm	(601)	CCCCATTAATTAGCCCTAGTGTGTGACATTCTTTTATTCTCCTATTGTACTTTGCGCATAGAACTTGTCAACTTCTAATATTTAGTGCTAATAATTGCTC
18 Gm Hm	(601)	COTCA HAA HAGCCCHAGIGI GACATICH THATICICC HATIG HACH IGCCCHAGAACTIG ICAACTICH ATHATI ACTIC
INRA /// GM	(596)	COTORITAAT LAGUC LAGIGI GIGACATICITITATI CICCIATIGIACITI GOCCATAGAACTICI CAACTICIAATITACIGO LAATAATIGO D
54 Gm Gm	(590)	concernant associations in the former and the second states and the second states in the second states in the second states and second s
04 On On	(001)	
		801 854
Harslevelue	(713)	UTTCCCCCTTTG
Arbane	(703)	TTTCGGGCTTTGA
Koshu	(693)	ITTCGGGCT
Räuschling	(700)	ITTCGGGCI
Black Rose	(697)	TTTCGGGCTT
Cardinal	(703)	TTTCGGGCT
1-84 Gm Gm	(703)	
1-54 Gm Hm	(703)	11106660111 <mark>0</mark> 4
1_30 Gm Gm	(000)	
1-30 Gill Gill 1-45 Gm Gm	(703)	
Regent	(,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	
	(738)	TTTCGGGGCTT
Dornfelder	(738) (704)	TTTCGGGCTT TTTCGGGCTTTGA
Dornfelder Kerner	(738) (704) (708)	TTTCGGGCTT TTTCGGGCTTTGA
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau	(738) (704) (708) (696)	TTTCGGGCTTGA TTTCGGGCTTTGA TTTCGGGCTTTGATC
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau Muskateller	(738) (704) (708) (696) (729)	TTTCGGGCTT TTTCGGGCTTTGA
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau Muskateller Riesling	(738) (704) (708) (696) (729) (708)	TTTCGGGCTTGA
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder	(738) (704) (708) (696) (729) (708) (702)	ITTCGGGCTT ITTCGGGCTTTGATC
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot	(738) (704) (708) (696) (729) (708) (702) (738)	TTTCGGGCTT TTTCGGGCTTTGATC
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner	(738) (704) (708) (696) (729) (708) (702) (738) (704)	TTTCGGGCTTTGA
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Felicia	(738) (704) (708) (729) (729) (708) (702) (708) (704) (698)	ITTCGGGCTT ITTCGGGCTTTGAC
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Felicia Grauburgunder	(738) (704) (708) (729) (708) (702) (708) (702) (703) (704) (698) (693)	TTTCGGGCTT TTTCGGGCTTGATCATACATGGGT
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Felicia Grauburgunder Schwarzziesling	(738) (704) (708) (729) (708) (702) (708) (702) (738) (704) (698) (693) (667)	TTTCGGGCTT TTTCGGGCTTTGATC TTTCGGGCTTTGATCAACATGGGT TTTCGGGCTTTGATCAACATGGGT TTTCGGGCTTTGATCAACATGGGT TTTCGGGCTTTGATCAACATGGGT TTTCGGGCTTTGATCAACATGGGT TTTCGGGCTTTGATCAACATGGGT TTTCGGGCTTTGATCAACATGGGT TTTCGGGCTTTGATCAACATGGGT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Felicia Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent	(738) (704) (708) (729) (708) (702) (708) (702) (704) (698) (693) (693) (774) (693)	TTTCGGGCTT TTTCGGGCTTTGA
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Felicia Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent Villaris	(738) (704) (708) (696) (729) (702) (702) (702) (703) (698) (693) (693) (667) (774) (693) (701)	ITTCGGGCTT ITTCGGCTTTGAT ITTCGGCTTTGATCATACATGGGT
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Felicia Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent Villaris 18 Gm Gm	(738) (704) (708) (696) (729) (702) (702) (702) (702) (704) (693) (667) (774) (693) (701)	TTTCGGGCTT TTTCGGGCTTTGATC TTTCGGGCTTTGATCATACATGGGT TTTCGGGCTTTGATCATACA TTTCGGGCTTTGATCATACA TTTCGGGCTTTGATCATACA TTTCGGGCTTTGATCA TTTCGGGCTTTGATCA TTTCGGGCTTTGATCA TTTCGGGCTTTGATCA TTTCGGGCTTTGATCA TTTCGGGCTTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTT TTTCGGGCTTTGATCATACATGGTAGGCCTCG TGTGGTCAACTATT TTATT GA TTTCGGGCTTTGATCATACATGGTAGGCCTCG TGTGGTCAACTATT TTATT GA TTTCGGGCTTTGAT TTTCGGGCTTTGATCATACATGGTAGGCCTCG TGTGGTCAACTATT TTATT GA
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Felicia Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent Villaris 18 Gm Gm	(738) (704) (708) (696) (729) (708) (702) (702) (703) (693) (693) (667) (774) (693) (701) (701)	TTTCGGGCTT TTTCGGGCTTTGAC
Dornfelder Kerner Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Felicia Grauburgunder Schwarzzriesling Dakapo St. Laurent Villaris 18 Gm Gm 18 Gm Hm INRA 777 Gm	(738) (704) (708) (696) (729) (708) (702) (702) (704) (693) (667) (774) (693) (701) (701) (701) (701) (701) (696)	TTTCGGGCTT TTTCGGGCTTTGAT
Dornfelder Kerner Müller-Thurgau Muskateller Riesling Dunkelfelder Traminer rot Silvaner Felicia Grauburgunder Schwarzriesling Dakapo St. Laurent Villaris 18 Gm Gm 18 Gm Hm INRA 777 Gm	(738) (704) (708) (696) (729) (708) (702) (708) (702) (704) (698) (693) (704) (693) (701) (701) (701) (701) (696) (696)	ITTCGGGCTT ITTCGGGCTTTGATC

9.3 Sequenzen für das Kandidatengen ERECTA





		601 700
Harslevelue	(494)	ATGACCTATTATAGTAAAGCCTATAAAAAACATTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTTTATGCTCTTTAAAACTCTCAGCTTCTCTTAGG
Arbane	(500)	ATGACCTATTATAGTAAAGCC <mark>T</mark> ATAAAAACATTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTT <mark>T</mark> ATGCTCTTAAAACTCTCAGCTTCTCTTAGG
Koshu	(112)	RIGACCIATIALASIAAASCCKA TAAAAAACATTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTT <mark>KA</mark> ATGCTCTTAAAACTCTCAGCTTCTCTTAGG
Rauschling	(498)	A IGACCIAITATAGIAAAGCCIA TAAAAACATIGIAICAITAA TATIGGTAITICCAAGIATAGITII TTAIGCICHAAAACICICCAGCIICICHIAGG
Cardinal	(502)	A IGACCIAITA A BIARABOCTA HARABOCTA I GIALCA LA LA LEGISTA L'OLA GIALA GIALI DE L'OLA GALA LA LA LA LA LA LA LA A IGACCIAITA A BIARABOCTA I A BABA D'ATTEGITA TA LA TATEGITATI TOCA GALA GALA TITA I GOLTA LA LA COLLEGITA COLL
1-84 Gm Gm	(503)	ATGACCTATTATAGTAAAGCCTATAAAAAACATTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTTTATGCTCTTTAAAACTCTCAGCTTCTCTTAGG
1-84 Gm Hm	(503)	ATGACCTATTATAGTAAAGCC <mark>T</mark> ATAAAAACATTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTT <mark>T</mark> ATGCTCTTAAAACTCTCAGCTTCTCTTAGG
M242 Hm	(490)	ATGACCTATTATAGTAAAGCC <mark>T</mark> A TAAAAACATT GTATCATAA TATTGGTATT TCCAA GTATA GTTTT T <mark>T</mark> ATGC TCTTAAAACT CTCAG CTTCT CTTTAGG
1-30 Gm Gm	(391)	ATGACCTATTATAGTAAAACCTTGTATCATATATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTTTTAGCTCTTAAAACCTCCAGCTTCTTTAGG
1-45 GM GM	(503)	A I GAULTATTATA GIARAGULTATAARAA UATTGTATUATATATATATGTATTTCCAA GTATAGTATTATGCTUTTAARAAUTULAGUTUTUAGUTUTTATA A TGAULTATTATA GTATAGTA A GTATGTATATATATATATTATTGCTATTTCCAA GTATA GTTTTTTATGCTUTTA AAAUTUTUAGUTUTTTTTA GA
Dornfelder	(503)	A GACCHATATAGUAAGOC LATAAAACAT GTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTTAGCTCTTAAAACTCTCCAGCTTCTTATAG
Kerner	(503)	ATGACCTATTATAGTAAAGCCTATAAAAAACATTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTTTATGCTCTTTAAAACTCTCAGCTTCTCTTAGG
Müller-Thurgau	(472)	ATGACCTATTATAGTAAAGCC <mark>T</mark> ATAAAAACATTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTT <mark>T</mark> ATGCTCTTTAAAACTCTCAGCTTCTCTTAGG
Muskateller	(152)	ATGACCTATTATAGTAAAGCCTATAAAAACATTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTTAAAGCTCTTAAAACTCTCAGCTTCTCATAGG
Riesling	(355)	A IGACCIAITATAGIAAAGCCIA TAAAAACCAITGIAICAITAA TAITGGTAITICCAAGIATAGITTI TTAIGCICICHAAGAACCIICICCICTIAGG
Traminer rot	(503)	A IGACCIALITATA OLARA ACCITATA A A A A LA TATA CALLA LA TATA CALLA CAL
Silvaner	(494)	A TGACCTATTATAGTAAAGCCT TATAAAACATTGTATCATAA TATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTT TTATGCTCTTAAAACT TCCAGCTTCTCTTAGG
Felicia	(503)	ATGACCTATTATAGTAAAGCCTATAAAAAACATTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTTTATGCTCTTTAAAACTCTCAGCTTCTCTTAGG
Grauburgunder	(503)	ATGACCTATTATAGTAAAGCC <mark>T</mark> ATAAAAACATTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTT <mark>T</mark> ATGCTCTTAAAACTCTCAGCTTCT CTTTAGG
Portugieser	(505)	ATGACCTATTATAGTAAAGCCTTATAAAAACATT GTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTT TTATGCTCTTAAAACT CTCAGCTTCT CTTTAGG
Schwarzriesling	(503)	A IGACCIAITATAGI AAAGCCI A FAAAAACATI GIAICATAA TATI GGIATI CCCAGI ATAGITTI TATIGCI CITAAAACCICI CAGCI TCI CITTAGG
St. Laurent	(183)	A IGACTATIATA STARAGECTATIAAAACATI STATEATATATATI SEGTETTI CAAGTATAGETTI TATEGETETTAAAACTI COGETTI CITAGA
Villaris	(501)	ATGACCTATTATAGTAAAGCCTATAAAAACATTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTTTATGCTCTTAAAACTCTCAGCTTCTCTTAGG
18 Gm Gm	(503)	ATGACCTATTATAGTAAAGCC <mark>T</mark> ATAAAAACATTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTT <mark>T</mark> ATGCTCTTTAAAACTCTCAGCTTCTCTTAGG
18 Gm Hm	(503)	ATGACCTATTATAGTAAAGCC <mark>T</mark> ATAAAAACATTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGTTTTT <mark>T</mark> ATGCTCTTAAAACTCTCAGCTTCTCTTAGG
INRA 777 Gm	(499)	ATGACCTATTATAGTAAAAACCTTGTATCATAATATTGGTATTTCCAAGTATAGGTTTTTTATAGCTCTTAAAACCTCCAGCTTCTTAG
INKA /// HIII 54 Gm Gm	(499)	A IGACTATIALASIAAASCELATAAAAACATIGIALCALAATATIGISTATTCCAASTATASTITTTATSCELTTAAAACTICASCHICIGHAGA
54 Oli Oli	(400)	
		701 800
Harslevelue	(594)	RETARGENTE AND A CONTRACT AND A CONTRACT OF THE CONTRACT OF THE ADDRESS AND A CONTRACT
Koshu	(212)	A TRACENTERRATIONAL CRECCALETTRICATED ACATTACTED TO CATE AT THE THEOREM CART TO TRACAT TEMARATICETTED TRACES T
Räuschling	(598)	A TARCETTICAACATERATCRCCCATCITATCATEGTACCATTRCTCTTCCTTEGTATCATERETCTTCTTAGATTTCTTAGATTTCAAATTCTTTCTTEGAT
Black Rose	(597)	A <mark>CTAACGTTTCAACATGAATCACCCATCTTATCATGGTACCATTACTCTTCCTTGTATTCATTGGTGGCAATTTCTGTAGATTTGAAATTCTTTCT</mark>
Cardinal	(602)	A <mark>CTAACGTTTCAACATGAATCACCCATCTTATCATGGTACCATTACTCTTCCTTGTATTCAT TGGTGGCAATT TCTGTAGATT TGAAA TTCTT TCTTGAT</mark>
1-84 Gm Gm	(603)	A TAACGTTICAACATGAATCACCCATCTTATCATGGTACCATTTATCTTICCTIGTATTCAT TGGTGGCAATTTCTGTAGAATTTCTTTCTTGAT
1-84 Gm mm M242 Hm	(603)	A FRACE IT CARLED AT CARCENCE CONCENTER CAREFUL THAT CATTOC THOSE AT CARLED AND AND AND AND AND AND AND AND AND AN
1-30 Gm Gm	(491)	A TARCETTICARCAT GRAATCRC CCATCITATICAT GET ACCA TTACT CTTCC TTETATICAT TEGTE GCAATT TCTET AGATT I GAAA TTCTT TCTTEGAT
1-45 Gm Gm	(603)	A CTAACGTTTCAACATGAATCACCCATCTTATCATGGTACCATTACTCTTCCTTGTATTCATTGGTGGCAATTTCTGTAGATTTGAAATTCTTTCT
Regent	(603)	A <mark>CTAACGTTTCAACATGAATCACCCATCTTATCATGGTACCATTACTCTTCCTTGTATTCAT TGGTGGCAATTTCTGTAGATTTGAAA TTCTTTCTTGAT</mark>
Dornfelder	(603)	A TRACET TICAACAI GAAT CAC CCAITCITTAT CATGET ACCAITTACT CTITICE TIGTATICAT TIGGT GCCAATT TICTET AGAT TICATAI TICTITICAT
Kerner Müller-Thurgeu	(603)	A DARCHTICARA IGAALIAC COALCHAIGHACHAIGHACHATHATHCTICCTTICHTICATHATHCATHCGIGGCAALITICHGTAGATHGAALICHTICHGAA
Muskateller	(252)	A TRACETTICAACATERATICAC CCATCITATCATEGTACCATTACT CITICCITEGTATICAT IGEIGECAATTICTETAEATTICATERATICTITCTIEAT
Riesling	(455)	A CTAACGTTTCAACATGAATCACCCATCTTATCATGGTACCATTACTCTTCCTTGTATTCATTGGTGGCAATTTCTGTAGATTTGAAATTCTTTCT
Dunkelfelder	(310)	A <mark>STAACGTTTCAACATGAATCACCCATCTTATCATGGTACCATTACTCTTCCTTGTATTCAT IGGTGGCAATT TCTGTAGATT TGAAA TTCTT TCTTGAT</mark>
Traminer rot	(603)	A TRACET TICAACAI GAAT CAC CCAITCITTAT CATGET ACCAITTACT CTITICE TIGTATICAT TIGGT GCCAATT TICTET AGAT TIGAAA TICTITICTIGAT
Felicia	(603)	A TRACET I CAACA CAACA CACCATCITATCA I GETACCA TACTOTICO TETATICATICE I GETEGOAATTICIETA BATTIGAATTICITICITE A
Grauburgunder	(603)	A TARCETTICAACATGAATCACCCATCTTATCATGETACCATTACTCTTCCTTGTATCAT IGGIGGCAATTTCTGTAGATTIGAAATTCTTTCTTGAT
Portugieser	(605)	A <mark>CTAACGTTTCAACATGAATCACCCATCTTATCATGGTACCATTACTCTTCCTTGTATTCATTGGTGGCAATTTCTGTAGATTTGAAATTCTTTCT</mark>
Schwarzriesling	(603)	A <mark>CTAACGTTTCAACATGAATCACCCATCTTATCATGGTACCATTACTCTTCCTTGTATTCAT TGGTGGCAATT TCTGTAGATT TGAAA TTCTT TCTTGAT</mark>
Dakapo St Jouropt	(279)	A TRACET TICACATERATCACCCATCTTATCATEGTACCATTACTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
Villaria	(601)	TARGET TO ACCERT AND A CAR CONTO THE CARGET ACCENTED THE TO THE TO ATTEND TO BE SOLVANT TO THE AND THE TO ATTEND AND THE TO ATTEND AND THE ATTEND AND THE ATTENDANT TO ATTENDANT
18 Gm Gm	(603)	A TAACGTTTCAACATGAATCACCCATCTTATCATGGTACCATTACTCTTCCTTGTATTCATTGGTGGCAATTTCTGTAGATTTGAAATTCTTTCT
18 Gm Hm	(603)	A <mark>CTAACGTTTCAACATGAATCACCCATCTTATCATGGTACCATTACTCTTCCTTGTATTCAT TGGTGGCAATTTCTGTAGATTTGAAATTCTTTCTTGAT</mark>
INRA 777 Gm	(599)	RETARCETITCARCATGARTCRCCCCATCITIATCATGGTACCATTACTCTTCCTTGTATTCATTGGTGGCCARTTTCTGTAGATTTCTTTCTTGAT
INKA /// HM 54 Gm Gm	(599)	A TRACENTERRATIONAL CRECCALETTRICATED ACATING TO THE THE TREATEST CALL THE ACATING AND THE ACA
54 Oli Oli	(303)	
		801 900
Harslevelue	(694)	GCTAAATTTTTCAAGCAGGCCATTGTTTTTTAGTATGCAGGTCATGCTTCTTGGTTTTGTGCTCCTTGGACGTTCTCTTGAAGAGAA
Arbane	(700)	GCIAAATITTTCAAGCAGGCCATTGTTTTTTTGTATGCAGGTCATGCTTCTTGGTTTTGTGCTCCTTGGAAGTCTTCTTGAAGAGAAGGAGGGGGGGG
Räuschling	(512)	CTABLETTICARCASCOLLIGITTITIAGALCASCILE CTABLETTICARCASCOLLIGITTITIAGALCASCILE
Black Rose	(697)	GCTAAATTTTTCAAGCAGGCCATIGTTTTTAGTAIGCAGGTCATGGTTCTEGGTTTTGTGCTCCTTGG
Cardinal	(702)	<mark>ectaaaitiiticaagcageccatiigitiittagt</mark> atecaget cateciticit egittiteetectocttegaceiitotti teaagagaagecgaggateage
1-84 Gm Gm	(703)	GCTARATITITICARCAGECCATIGETTTITITAGTATECAGETCATECTTCTTGETTTIGECCTCCTTGGACGTTCTCTTGARGAGARGAGGAGGAGGACGAGGATCAGG
1-84 Gm Hm	(703)	GCTAAATTTTTCAAGCAGGCCATTGTTTTTTAGTATGCAGGTCATGCTTCTTGGTCTTCTTGGACGTCTTCGAGGTCTTGAAGAGAGGGGGGGG
1-30 Gm Gm	(690)	GCTABATTITTCBBCCBCCCATTETTTTTBGTBTCCBGTCATGCTCTTGCTGCTCTTCBBCTCCTTCBBCBCBBCCCBBCBTCBCC
1-45 Gm Gm	(703)	GCTARATTITTCARGCAGGCCATTGTTTTTTAGTATGCAGGTCATGCTTCTTGGTTTTGTGCTCCTTGGACGTTCTCTTGAAGAGAAGGCGAGGATCAGG
Regent	(703)	<mark>sctaaatittitcaascasseccatitsittittas t</mark> atecaset cates tittitsetti tistee teetti gaestittisaasasseesas sateas s
Dornfelder	(703)	GCTABATTITICARGCAGGCCATTGTTTTTAGTATGCAGGTCATGCTTCTTGGTTTTGTGCTCCTTGG
Kerner Müller-Thurse	(703)	OUTABLE TITLE ASCAGECULATION TITLE AND
Muskateller	(072)	CTABLETTICARCAGECCALIGETTICARTAGEAGECCARGETCETCATTERSCENCETCARA
Riesling	(555)	GCTARATTTTTCRAGCAGGCCATTGTTTTTTAGTATGCAGGTCATGCTTCTTGGTTTTGTGCTCCTTGG
Dunkelfelder	(410)	GCTAAATTTTTCAAGCAGGCCATTGTTTTTTAGT
Traminer rot	(703)	GCIAAATITITICAAGCAGGCCATIGITITITAGI <mark>ATGCAGGTCATGCTTCTTGGTTTTGTGCTCCTTGGA</mark> A
Silvaner	(694)	GUIAAAITITITIAAGCASGCCATTGITITITIAGTAIGCAGGTCATGCTITITITIGTG
Grauburgunder	(703)	CTALATTITICALCASCONTOTITITIAN FINCE AST CARGE CATCHIEFT TOTOCTOTICATE TACCONTON
Portugieser	(705)	SCTAAATTTTTCAAGCAGSCCATTGTTTTTTAGTATGCAGGTCATGCTTCTTGGTTTTGTGCTCCTTGGACGTTCTCTTGAAGAGAAGGCGAGGATCAGG
Schwarzriesling	(703)	<mark>ectaaaitiiticaagcageccatiigitiittagt</mark> ai <u>gcaget catecticti</u> egitiitigteciccitiggacetictictigaagagecgaggatcage
Dakapo	(379)	GCTAAATTTTTCAAGCAGGCCATTGTTTTTTAGT <mark>ATGCAGGTCATGCTTCTT</mark>
St. Laurent	(383)	GUIARATITITICA AGRAGECCATIGITITIAGIA IGLAGICATOLICITICITEGTETTOTOCICITIGI
18 Gm Gm	(703)	GCTARATTITICARGCAGGCCATIGTTITITAGTATECAGET CATECTICTEGTTITIGTECTCCTTEGACETTCCTTEGARGAGAGGCCARGATCAGE
18 Gm Hm	(703)	SCTAAATTTTTCAAGCAGSCCATTGTTTTTTAG <mark>T</mark> ATGCAGGTCATGCTTCTTGGTTTTGTGCTCCTTGGACGTTCTCTTGAAGAGAAGAAGGAGCAAGGATCAGG
INRA 777 Gm	(699)	<mark>ectaaaitiiticaagcageccatiigittiittagt</mark> aigcaggicaigciitciitggittiggecicciitggacgiitciitgaagaagagcgaaggatcagg
INRA 777 Hm	(699)	GCTABATTITICEASCASSCCAITGITTITIASTATECASSICATECTTCTIGETTITGICCCCTTGBACGITCTCTGBAGBAGBAGGCGAGGATCAGG
54 Gm Gm	(663)	GUTAAAT ITI TUAAGUAGGCCAT TGTTT TTTAGTATGCAGGT CATGCTTCTT GGTTT TGTGCTCCTT GGACGT TCTCT TGAAGAGAGAGGCGAGGATCAGG

9.4 Sequenzen für das Kandidatengen REVOLUTA

		1 100
Harslevelue	(1)	
Koshu	(1)	
Räuschling	(1)	
Black Rose	(1)	
1-84 Gm Gm	(1)	
1-84 Gm Hm	(1)	
M242 Hm	(1)	
1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm	(1)	CGAG
Regent	(1)	
Dornfelder	(1)	
Kerner Müller-Thurgau	(1)	
Muskateller	(1)	
Riesling	(1)	
Dunkelfelder Traminer rot	(1)	
Silvaner	(1)	
Felicia	(1)	
Grauburgunder	(1)	
Schwarzriesling	(1)	- CGAG
Dakapo	(1)	
St. Laurent	(1)	
18 Gm Gm	(1)	
18 Gm Hm	(1)	
INRA 777 Gm	(1)	
54 GM GM	(1)	
		101 200
Harslevelue	(1)	<mark>BGG</mark> TTGGGTTGGTGTTTATGTCGTCTAAATTATACACATAGATAAAAGGGGGGTTGATTGA
Arbane	(1)	
Räuschling	(1)	Georiges in Georiges in the following that have a large marked by the following
Black Rose	(5)	GGAGGAG <mark>GGGTTGGGTTGGTGTTTATGTCGTCTAAATTATACACATAGATAAAAGGGGGTTGATTGA</mark>
Cardinal	(21)	GGAGGAG CC TIGGETGGTTATGCGTCTAAATTATACACATASATAAAGGGGTTGATTGATCGCTACGCGGGTTGCCTTCCTT
1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm	(1)	Goog Tiggel Iggel Iggel Iggel Iggel Iggel and Iggel Andre Analog South and South
M242 Hm	(1)	GITGGGTTGGTGTTTATGTCGTCTAAATTATACACATAGATAAAAGGGGGTTGATGATGCTAGCGGGTTTGTCTTCCTTC
1-30 Gm Gm	(5)	GGAGGAG <mark>GGG</mark> TIGGGTIGGTGTITATGICGTCTAAATTATACACATAGATAAAAGGGGGTIGATIGAT <mark>GCCTAGCGGG</mark> TIIGICTICCTICCTICTICCIC
1-45 Gm Gm	(1)	TIGGGTIGGTGTITATGCGTCTAAATTATACACATAGATAAAGGGGTIGATIGAT GCCTACGGGTITGCTTCCTTCTTACTCCC
Dornfelder	(1)	966 TIGGTTGGTGTGTGTGTCTAAATTATACACATAGATAAARGGGGGTTGATGATGCCTACGGGGTTGTCTTCCTCTTACTCTC
Kerner	(1)	<mark>ttgggttggtgtttatgtcgtctaaattatacacatagataaaagggggttgattga</mark>
Müller-Thurgau Muskateller	(1)	TGGGTTGGTGTTATGCGTCTAAATTATACACATASATAAAGGGGTTGATTGATGCCTACGGGTTGCTTCCTTCTTACTCCC
Riesling	(1)	
Dunkelfelder	(1)	<mark>ses</mark> ttgggttggtgtttatgtcgtctaaattatacacatagataaaagggggttgattga
Traminer rot	(1)	CTIGGTTGGTTTTATGTCGTCTTAAATTATACACATASATAAAAGGGGGTTGATTGATCCTACGCGGTTTGTTCTTCTTCTTCTTCTTCTCTC
Felicia	(1)	Gettgeftgetgttatsterertaattatacataataataataataataataataataataa
Grauburgunder	(1)	<mark>b</mark> ttgggttggtgtttatgtcgtctaaattatacacatagataaaagggggttgattga
Portugieser	(5)	GGAGGAGGTTGGGTTGGTGTTTATGTCGTCTAATTTATACACATAGATAAAAGGGGGTTGATTGA
Dakapo	(1)	TGGGTTGGGTTGGTGTTTATGTCGTCTAATTATACACTASATAAAGGGGGTTGTGATGATGAGCGGGTTGGTGGTTGGTGGTTGGT
St. Laurent	(1)	<mark>566</mark> TTGGGTTGGTGTTTATGTCGTCTAAATTATACACATAGATAAAAGGGGGTTGATTGA
Villaris	(1)	
18 Gm Hm	(1)	Geo Tigget Tgets TITATGIGET CHARATATATACACHASATASAGGGGETGATTATCCCGGGETGETGETTGCTTCCTCTCTCTCCTC
INRA 777 Gm	(1)	<mark>6</mark> TTGGGTTGGTGTTTATGTCGTCTAAATTATACACATAGATAAAAGGGGGTTGATTGA
54 Gm Gm	(1)	<mark>TTGGGTTGGTGTTTATGTCGTCTAAATTATACACATAGATAAAAGGGGGTTGATTGA</mark>
Harslevelue	(94)	201 300 BACATETTAGGETTTTTTCCACTCTTTTTTCCCCALTTCCCALTTCCCALCCTCCALCCCALCCCCALCCCCCALCCCCCCALCCCCCCCC
Arbane	(94)	SACATGTTTAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTTCTCTGTTTTTTCTCTCAATTTCTCGGTGTTTCCCA <mark>A</mark> GCTTTCTGATGCGGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC
Koshu	(94)	GACATGITTAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTCTCGTTTTTYCTCTCAATTTCTCGGTGTTTCCCAMGCTTTCTGATGCGGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC
Black Rose	(105)	GACATSTINAGGSTITTTTCTCACTCTTTCTCTSTTTTTCTCTCAATTTCTCGSTGTTTCCCAGCTTTCTGATSCGGGGAAAGSTGGCCCTCTC
Cardinal	(121)	SACATGTTTAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTTCTCTGTTTTTTCTCTCAATTTCTCGGTGTTTTCCCA <mark>A</mark> GCTTTCTGATGCGGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC
1-84 Gm Gm 1-84 Gm Hm	(95)	GACATGTTAGGGTTTTTTTCCACTCTTTCCCGTTTTTCCCGGTGTTCCCAAGCTTCCAAGCGGGGAAAAGTGGGCCCCCTC
M242 Hm	(92)	GACATGTITAGGGTTTITTCCCACTCTTCTCTGTTTTCCCCCAATTCCCGGGGTTTCCCAAGCTTCTGATGCGGGGGAAAGTGGGCTCTCTCC
1-30 Gm Gm	(105)	SACATGTTTAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTCTCTGTTTTTCCCAATTTCTCGGTGTTTCCCA <mark>A</mark> GCTTTCTGATGCGGGGAAAAGT6GGCTCTCTTC
1-45 Gm Gm	(91)	GACATGTTAAGGTTTTTTCTCACTCTTTCTCTGTTTTTCCTCAATTCCCGGTGTTCCCAAGCTTTCTGATGCGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC
Dornfelder	(94)	GACATGTITAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTTCTCTGTTTTTTTCTCCAATTCTCGGTGTTTCCCAAGCTTTCTGATGCGGGGGAAAGTGGGCTCTCTTC
Kerner	(91)	SACATGTTTAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTTCTCTGTTTTTTCTCTCAATTTCTCGGTGTTTCCCA <mark>A</mark> GCTTTCTGATGCGGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC
Müller-Thurgau Muskateller	(91)	GACAIGIIIAGGGTTTTTTTTCTCACTCTTTTCTCTGTTTTTTCTCCAATTTCTCGGTGTTTCCCAAGCTTTCTCGATGCGGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC
Riesling	(92)	GACATGTTTAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTTCTCTGTTTT <mark>C</mark> CTCTCAATTTCTCGGTGTTTCCCAAGCTTTCTGATGCGGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC
Dunkelfelder	(94)	GACATGTTTAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTCTCTGTTTT <mark>T</mark> CTCTCAATTTCTCGGTGTTTCCCA <mark>A</mark> GCTTTCTGATGCGGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC
Traminer rot Silvaner	(93)	GACAIGIIIAGGGTTTTTTTTTUTCACTCTTTTTCTCGTTTTTCCCAATTTCTCGGTGTTTCCCAAGCTTTCTCGATGCGGGGAAAAGTGGCCTCTCTCC GACAIGTTTAGGGTTTTTTTTCTCACTCTTTTCTCTGTTTTTC
Felicia	(94)	GACATGTTTAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTTCTCTGTTTTTTCTCCAATTTCTCGGTGTTTCCCAAGCTTTCTGATGCGGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC
Grauburgunder	(92)	GACATGTTTAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTTTCTCTGTTTTT <mark>C</mark> CTCTCAATTTCTCGGTGTTTCCCA <mark>A</mark> GCTTTCTGATGCGGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC
Fortugieser Schwarzriesling	(105)	GAUARDELEASSEELETTTTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
Dakapo	(91)	SACATGTTTAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTCTCTGTTTTTCCCGTCTTCTCGGTGTTTCCCCAAGCTTTCTCGATGCGGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC
St. Laurent	(94)	GACATGITTAGGGITITITTTCTCACTCITITCTCIGITITI <mark>C</mark> CICICAATTICICGGIGITICCCA <mark>A</mark> GCITICIGAIGCGGGGAAAAGIGGGCICICITC
Villaris 18 Gm Gm	(94)	GAUAIGIIIAGGGIIIIIIIICUUGUUIIIGUUTTICTCTCAATTTCTCGGIGIITTCCCA <mark>R</mark> GCTTTCTGATGCGGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC GACAIGIITAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTCTCTGTTTTT <mark>C</mark> TCTCAATTTCTCGGTGTTTCCCA <mark>R</mark> GCTTTCTGATGCGGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC
18 Gm Hm	(94)	GACATGTTTAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTCTCTGTTTTTCCCGTCTCTCGGTGTTTCCCCAAGCTTTCTGATGCGGGGGAAAGTGGGCTCTCTTC
INRA 777 Gm	(92)	SACATGTTTAGGGTTTTTTTCTCACTCTTTTCTCTGTTTTT <mark>C</mark> CTCTCAATTTCTCGGTGTTTCCCCA <mark>A</mark> GCTTTCTCGATGCGGGGAAAAGTGGGCTCTCTTC
54 Gm Gm	(91)	BAGAIGTTAGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

		301 400
Harslevelue	(194)	TCCGGAGAGCCTTTGCTGATCTCACTACTCCACCCCTCTTTCCCTTGTTTTCTAGTGCCTGCGTGCCTTCCGTTTTTACCTGCCTTTTTCATCCTGATT
Arbane	(194)	TCCGGGGGGGGCCTTCGCTGCTCCACTACTCCCCCCCTCTTTCCTGCTGCCGGCCTTCCGTTTTTACTGCCTGC
Räuschling	(194)	COGGAGAGECTITECTATICTECTORCECCTTETTICCTETTITECTORCECCTECTTECTTECTITETTECCTECTTETT
Black Rose	(205)	TCCGGAGAGCCTTTGCTGATCTCACTACTCCACCCCCTCTTTCCCCTTGTTTTCTAGTGCCTGCGTGCCTTCCGTTTTTACCTGCCTTTTTCATCCTGAT
Cardinal	(221)	rccggagagcctttgctgatctcactactccacccctctttcccttgttttctagtgcctgcgtgccttccgtttttacctgccttttttcatcctgatt
1-84 Gm Gm	(195)	TCCGGAGAGCCTTTGCTGATCTCACTACTCCACCCCCTTTTTCCTGTTTTTCTAGTGCCTGCGTGCCTTTCGTTTTTACCTGCCTTTTTTCATCCTGAT
1-84 Gm Hm	(195)	ICCGGAGAGCCTTTGCTGATCTCACTCCACCCCTCTTTCCCTGTTTTCTAGTGCCTGCGTGCCTTCCGTTTTTACCTGCCTTTTTTCATCCTGAT
M242 Hm	(192)	recegnade control of a control
1-30 Gm Gm	(203)	
Regent	(191)	TCCSGARAGCCTTTGCTGATCTCACTACTCCACCCCTCTTTCCCTTGTTTCTAGTGCCTGCGTGCG
Dornfelder	(194)	rccggagagcctttgctgatctcactactccacccctctttcccttgttttctagtgcctgcgtgccttccgtttttacctgccttttttcatcctgat
Kerner	(191)	rccggagagcctttgctgatctcactccccccctctttcccttgttttctagtgcctgcgtgccttccgtttttacctgccttttttcatcctgat
Müller-Thurgau	(191)	ICCGGAGAGCCTTTGCTGATCTCACTCCACCCCTCTTTCCCTGTTTTCTAGTGCCTGCGTGCCTTCCGTTTTTACCTGCCTTTTTCATCCTGAT
Muskateller	(191)	TCCGGAGAGCCTTTGCTGATCTCACTCCACCCTCTTTCCCTGGTTTTCTAGTGCCTGCGTGCCTCCGTTTTTCACTGCCTGGTTTTCCACCGGACGCCTCCGTTTTTCCACCGGACGCCTCCGTTTTTCCACCGGACGCCTCCGTTTTTCCACCGGACGCCTCCGTTTTTCCACCGGACGCCTCCGGACGCCGCCGCCTCCGGACGCCGCCGCCGCCTCCGGACGCCGCCGCCCTCCGGACGCCCGCC
Riesling Dunkelfelder	(192)	
Traminer rot	(193)	TCCGGAGAGCCTTTGCTGATCTCACTACTCCACCCCTCTTTCCCTTGTTTTCTAGTGCCTGCGTGCCTTCCGTTTTTACCTGCCTTTTTCATCCTGAT
Silvaner	(194)	rccggagagcctttgctgatctcactactccacccctctttcccttgttttctagtgcctgcgtgccttccgtttttacctgccttttttcatcctgatt
Felicia	(194)	TCCGGAGAGCCTTTGCTGATCTCACTACTCCACCCCTCTTTCCCTTGTTTTCTAGTGCCTGCGTGCCTTCCGTTTTTACCTGCCTTTTTCATCCTGAT
Grauburgunder	(192)	ICCGGAGAGCCTTTGCTGATCTCACTCCACCCCTCTTTCCCTGTTTTCTAGTGCCTGCGTGCCTTCCGTTTTTACCTGCCTTTTTCATCCTGAT
Portugieser	(205)	TCCGGGGGGGGCCTTCGCTGCTCCACTACTCCCCCCCTCTTTTCCTGCTGCCGGGCCTTCCGTTTTTACTGCCTGC
Dakano	(194)	
St. Laurent	(194)	TCCGGAGAGCCTTTGCTGATCTCACTACTCCACCCCCTCTTTCCCCTTGTTTTCTAGTGCCTGCGTGCCTTCCGTTTTTACCTGCCTTTTTCATCCTGAT
Villaris	(194)	CCCGGAGAGCCTTTGCTGATCTCACTACTCCACCCCTCTTTCCCTTGTTTCTAGTGCCTGCGTGCCTTCCGTTTTTACCTGCCTTTTTCATCCTGAT
18 Gm Gm	(194)	TCCG6A6A6cCTTTGCTGATCTCACTACTCCACCCCTCTTTTCCTAGTGCCTGCGTGCCTTCCGTTTTTACCTGCCTTTTTCATCCTGAT
18 Gm Hm	(194)	ICCG6AGAGCCTTTGCF6ATCTCACTACTCCACCCCCTCTTTTCCAGTGCCTGCGTGCCTTCCGTTTTTACCTGCCTTTTTTCATCCTGAT
INRA 777 Gm	(192)	In the segment of the fact that has the concentration of the transformed and the segment of the second and the second sec
54 Gm GM	(191)	
		401
Harslevelue	(294)	500 Tegete beste beschertegettettettege ettettetesesses bertekestettettegettettetesesses
Arbane	(294)	TAGCTCAGAAATAACACCCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAGAAAAATAGGAGAT
Koshu	(294)	TAGCTCAGAAATAACACCAACGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAAAAATATGAGGATT <mark>YTTTTTGGGTT</mark> TCAGACTTTAGAAT
Räuschling	(294)	TAGCTCAGAAATAACG <mark>CCAA</mark> GATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAAAAATATGAGGATT <mark>C</mark> TTTTTGGGTT <mark>-CA</mark> GACTTTAGAAT
Black Rose	(305)	TAGCTCAGAAATAACACCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAGAAAATATGAGGATTCTTTTGGGTTTCAGACTTTAGAAT
Cardinal	(321)	TAGCTCAGAAATAACACCAGATTGGGTTTCTTTGGACGTGTTGGCGGGTTTCTGAGGGGGGGG
1-84 Gm Hm	(295)	TAGCTCAGAAATAACCCCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTGTGCAAGTTCTGAGGGAAAATATGAGGAT
M242 Hm	(292)	TASCTCAGAAATAACGCCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAAAAATATGAGGATTCTTTTGGGTT-CAGACTTTAGAAT
1-30 Gm Gm	(305)	TAGCTCAGAAATAAC <mark>G</mark> CCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAAAATATGAGGAT <mark>TC</mark> TTTTGGGTT <mark>-</mark> CAGACTTTAGAAT
1-45 Gm Gm	(291)	TAGCTCAGAAATAACGCCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAAAATATGAGGATT <mark>C</mark> TTTTTGGGTT <mark>-</mark> CAGACTTTAGAAT
Regent	(291)	TAGCTCAGAAATAACCCCCAAGATTGGGTTTCTTGGACCTGTTTGTGCAGATTTCTGAGGAGAAAATATGAGGATTTTTTTGGGGTTCCAGACTTTAGAAT
Dornielder	(294)	I AGUICAGARA I AAUGULAAGA II GGUITICII I GAUUTII I GIGACU AGUITICI GAGGAGAARAI A I GAGATI OTTII I GGUITI CAGAU TAGUICAGA AATAA GUCAAGA ITGGGITICII I GAUUTIGIGGA ATTICI GAGGAGAARAI A I GAGATI OTTII GGGITI CAGAUTIAGAAT
Müller-Thurgau	(291)	TAGE CAGAAATAACACAAAATIGGTTTCTTGGACCCGTTGTGCAGTTCTGAGGAGAAATATGAGATTCTTTTGGGTTTCAGACTTAGAAT
Muskateller	(291)	TAGCTCAGAAATAACACCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAAAATATGAGGAT <mark>TC</mark> TTTTTGGGTT <mark>CAGACTTTAGAAT</mark>
Riesling	(292)	TAGCTCAGAAATAACACCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAAAATATGAGGATT <mark>C</mark> TTTTTGGGTT-CAGACTTTAGAAT
Dunkelfelder	(294)	TAGCTCAGAAATAACAACAAGATTCGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAGAAAATATGAGGATTCTTTTTGGGTT-CAGACTTAGAAT
Traminer rot	(293)	TAGCTCAGAAATAACGCCAAGATTGGGTTTCTTTGGACGGGTTGGCGGGTTCGGGGGGGG
Felicia	(294)	TAGCTCAGAAATAACACCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTGTGCAGATTCTGAGGGAAAATATGGAGAT
Grauburgunder	(292)	TASCTCAGAAATAACSCCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAAAAATATGAGGATTCTTTTTGGGTT-CAGACTTTAGAAT
Portugieser	(305)	TAGCTCAGAAATAAC <mark>RCCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAAAATATGAGGATT</mark> CTTTTTGGGTT-CAGACTTTAGAAT
Schwarzriesling	(294)	TAGCTCAGAAATAAC <mark>G</mark> CCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAAAATATGAGGAT <mark>TC</mark> TTTTTGGGTT <mark>-</mark> CAGACTTTAGAAT
Dakapo Ca Lauraat	(291)	TAGCTCAGAAATAACGCCCAAGATTGGGTTCTTTGGACCTGTTTGGCAGATTCTGAGGAGAAAATATGAGGATT TTTTTGGGTCCAGACTTTAGAAT
St. Laurent Villaria	(294)	IABCICABAAAIAACSICAABAIIGGGIIICIIIGBACCIGIIIGIGACAATIICIGAGABAAAAAIAIGAGGAI LIIIIGGGII CASACIIIAGAA Taccicaabatba cabaataagattaattaatta cotattictacabatticaababataataa ta tatti aadatti cabatti cabatti cabatti
18 Gm Gm	(294)	TAGCTCAGAAATAACCCCAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGGAAAATATGAGGATTTTTTTGGGTT-CAGACTTAGAT
18 Gm Hm	(294)	TAGCTCAGAAATAACGCCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAAAATATGAGGAT <mark>TC</mark> TTTTTGGGTT <mark>-</mark> CAGACTTTAGAAT
INRA 777 Gm	(292)	TAGCTCAGAAATAAC <mark>G</mark> CCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTTGTGCAGTTTCTGAGGAAAATATGAGGAT <mark>TC</mark> TTTTGGGTT <mark>-</mark> CAGACTTTAGAAT
54 Gm Gm	(291)	TAGCTCAGARATARCS <mark>CCAAGATTGGGTTTCTTTGGACCTGTTGTGCAGTTTCTGAGGAGAAATATGAGGATT</mark> CTTTTGGGTT <mark>TCAGACTTTAGAAT</mark>
		501 600
Harslevelue	(394)	aatcagaggtccagtttggacaatccttcatccaagcaataggttggggttttttcacaaaaatacagacccttgtgtgtg
Arbane	(394)	ARTURISAGUTULAGTTIGGACARTUCTICATUCAAGGATAGGTTGGGGTTTITICACAAAARTACAGACCUTTGTGTCTGTATGCGGCGGTGCGGACAA
Räuschling	(394)	ART CARACTECTART TO CACARTECT TO A CONSCIENT AND TO COST IT TO CACARART A CAGACCUT TO TO CONSCIENCE AND TO CONSCIENCE AND TO CONSCIENCE AND TA CONSCIENCE
Black Rose	(405)	AATCASAGCTCCASTITIGGACAATCCTTCATCCAAGCAATAGGTTGGGGTTTTTTCACAAAAATACAGACCCTTGTGTCTGTATGCTGCCCASTCTAGC
Cardinal	(421)	AATCAGAGGTCCAGTTTGGACAATCCTTCATCCAAGCAATAGGTTGGGGTTTTTTCACAAAAATACAGACCCTTGTGTCTGTATGCTGCTCAGT
1-84 Gm Gm	(394)	ARTCAGAGCTCCAGTTTGGACAATCCTTCATCCAAGCAATAGGTTGGGGGTTTTTCACAAAAATACAGACCCTTGTGTCTGTATGCTGCTCAGC
1-84 Gm Hm	(394)	AATCAGAGGTCCAGTTGGACAATCCTTCATCCAGGCAATAGGTTGGGGGTTTTTTCCAGAAAATACAGGCCCTTGTTCTGTATGCTGGTCAGCCAGC
M242 Hm 1-30 Gm Gm	(391)	ARICAGAGCICCAGIIIGGACARICCIICAICCARGCARIAGGIIGGGGIIIIICCACARAARICAGACCCIIGIGUIGIAIGUIGCICAGCICIGCU
1-45 Gm Gm	(390)	ATCAGAGCTCCAGTTTGACAATCCTCATCCAAGCAATAGGTTGGGGTTTTTTCACAAAATACAGACCCTTGTCTGTATGCTGCTCAGCACTCGC
Regent	(391)	AATCAGAGCTCCAGTTTGGACAATCCTTCATCCAAGCAATAGGTTGGGGTTTTTTCACAAAAATACAGACCCTTGTGTCTGTATGCTGCTCAGTTCTGCC
Dornfelder	(394)	aatcagagctccagtttggacaatccttcatccaagcaataggttggggttttttcacaaaaatacagacccttgtgtctgtatgctgctcag <mark>t</mark> tctgcc
Kerner	(391)	AATCAGAGGCTCCAGTTTGGACAATCCTTCATCCAAGCAATAGGTTGGGGTTTTTTCACAAAAATACAGACCCTTGTGTCTGTATGCTGCTCAG <mark>T</mark> TCTGCC
Müller-Thurgau	(391)	AATCAGAGGTCCAGTTTGGACAATCCTTCATCCAAGGCAATAGGTTGGGGGTTTTTTCCACAAAAAATACAGGACCCTTGTTGCTGGTGCTGGTCGG
Riesling	(391)	ART CARACTECCART TO CARACTECT CARCENCIA ROOT TO COST IT IT CARACTER ACCOUNT OF TO CONTRACT CONTRACTOR CON
Dunkelfelder	(393)	AATCAGAGGCTCCAGTTTGGACAATCCTTCATCCAAGCAATAGGTTGGGGTTTTTTCACAAAAATACAGACCCTTGTGTGTG
Traminer rot	(392)	AATCAGAGGTCCAGTTTGGACAATCCTTCATCCAAGCAATAGGTTGGGGTTTTTTCACAAAAATACAGACCCTTGTGTCTGTATGCTGCTCAGC
Silvaner	(393)	AATCAGAGCTCCAGTTTGGACAATCCTTCATCCAAGCAATAGGTTGGGGTTTTTCACAAAAATACAGACCCTTGTGTCTGTATGCTGCTCAG <mark>T</mark> TCTGCC
Felicia	(393)	ARTCASAGCTCCASTTTSGACARTCCTTCATCCASGCARTAGGTTGGGGTTTTTTCACARAATACAGACCCTTGTGTCTGTATGCTGCTCAST
Grauburgunder	(391)	ART CHARGET COAST IT GGACART CUTTOR CUCARGUARTAGGT TGGGGTTTTTTCACARARATACAGACCCTTGTTCGTATAGCTGCTGCCGCCCGC
Schwarzriesling	(393)	ATCR38GCTCCASTTIGGACAATCCTTCATCCAAGCAATAGGTGGGGTTTTTCACAAAAATACAGCCCTTGJGTCGTATGGTGCGGGAGCA
Dakapo	(390)	AATCASAGCTCCASTTT5GACAATCCTTCATCCAAGCAATAGGTT6GGGTTTTTTCACAAAAATACAGACCCTT61GTC1GTATGCT6CCCAGCTCAGC
St. Laurent	(393)	AATCAGAGCTCCAGTTTGGACAATCCTTCATCCAAGCAATAGGTTGGGGTTTTTTCACAAAAATACAGACCCTTGTGTCTGTATGCTGCTCAGC
Villaris	(394)	aatcasageteeasttigsacaateetteateeastageatagestgegettttteacaaaatacagaeeettegetetgetegeteast
18 Gm Gm	(393)	ART CASAGET CLAST TEGECARTCCTTCATCCARGCARTAGGT TEGEGTTTTTCACCARARATACAGACCCTTEGTCTGTATGCTGCTCAGC
INRA 777 Gm	(393)	ATCRSGCCCCSGTTGGSCARTCTTCRTCCRSGCATAGGTGGGGTTTTTCRCARAMAIACRCGCCTTGTGTCTGTFGGCGGTGCGCCGCGCGCGCGCGCGC
54 Gm Gm	(391)	RATCAGAGCTCCAGTTIGGACAATCCTTCATCCAAGCAATAGGTIGGGGTITITICACAAAAATACAGACCCTTGIGTCIGIAIGCTGCIGCIAGT

		601 700
Harslevelue	(494)	CAAGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGGACTGTCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGACCAGGAAACTTCATATCCTATCC
Arbane	(494)	SAAGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGTCCAAAAGAGAAGAGAGGCTGACCAGACCAGGAAAACTTCATATCCTATCC
Koshu	(494)	GAAGGATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGGTCGAAAAGAGAAGACGAAGAGGTGACCAGACAGGAAAGTTCATATCCTATCC
Rauschling Black Pose	(493)	GARGCATITIGCCCGIACCTIGGCGGCGARGCGARGIGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
Cardinal	(521)	GAAGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGTCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGACCAGGAAAACTTCATATCCTATCC
1-84 Gm Gm	(494)	GAAGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGTCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGGAAGACCTCATATCCTATCC
1-84 Gm Hm	(494)	GAAGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGTCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGACCAGGAAACTTCATATCCTATCC
M242 Hm	(491)	GAAGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGGCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGAAACTTCATATCCTATCC
1-30 Gm Gm 1-45 Gm Gm	(504)	GARGATITIGGCGTRCCTTGGTCGCTAGCCATRGTGTGGCGTGTCGRACGGCGARGAGAGAGAGGCGGGCGGCCAGGCCA
Regent	(491)	GAAGCATTITIGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGTCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGACCAGAACATCTATACCTATCC
Dornfelder	(494)	GAAGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGTCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGACCAGGACATCATATCCTATCC
Kerner	(491)	SAAGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGTCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGACCAGGAAACTTCATATCCTATCC
Müller-Thurgau	(491)	GAAGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGTCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGACCAGGAAACTTCATATCCTATCC
Muskateller	(491)	
Dunkelfelder	(493)	BARGUATITIGOCUSIRUCIIGGUS AGUGAIRATIGGAU IS GUALAS CARAGAGAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
Traminer rot	(492)	GARGCATITIGGCCGTACCTIGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACIGTCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGACCA
Silvaner	(493)	GAAGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGTCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGAACAGGAAACTTCATATCCTATCC
Felicia	(493)	GAAGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGTCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGACCAGGAAACTTCATATCCTATCC
Grauburgunder	(491)	GAAGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCCATAGGCCATAGTGTGGACTGGCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCCGACCAGGCCAGAAACTTCATATCCTATCC
Portugieser	(504)	GAAGGATTTTTGGCCGTACCTTGGTCGGCGATAGTGTGGACTGTCCAAAGAGGAGGAGGAGGAGGCGAGGCGAGGCGAGGCTGACTGTCGTCATCC
Dakapo	(490)	BARGUALITI GOCCETACCITEGTOCOLIAGI DI GACITATO CARAGAC
St. Laurent	(493)	GARGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGGCCGTCCARAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGACCA
Villaris	(494)	CARGCATTTTGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGTCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGACCAGGAAACTTCATATCCTATCC
18 Gm Gm	(493)	SAAGCATTITIGGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGTCCAAAAGAGAAGACGAAGAGGCTGACCAGACCAGGAAACTTCATATCCTATCC
18 Gm Hm	(493)	SAASUATITITSGCCGTACCTTGGTCGCTAGGCCATAGTGTGGACTGTCCAAAAGAGAAGAGAGAG
INKA 777 GM 54 Gm Gm	(491)	GARGERTITTGGCCGLGCCTIGCTCGCTGCCGTGGCCGTGGCCGGCGGGGGGGGGG
51 011 011	(121)	
Harelevelue	(504)	101 Bagetereterebeeterebebeeterebebeeterebebeeterebebeeterebebebeeterebebeeterebebeeterebebeeterebebeeterebebeeter
Arbane	(594)	AAGCTGTCTGTCCAGCTTCTGATATCACACCATCGACGACCTTACTCAATCCCGGTCCAAAATAACCTGTCTCTCAAAGGTGTTCGGTGCGGTTTCG
Koshu	(594)	ABGCTGTCTGTCCAGCTTCTGATATCACACCATCGACGAACCTTACTCAATCCCCGGTCCAAAATAACCTGCTCCCAAAGGGTGTTGCGTGCG
Räuschling	(593)	aagctgtctgtccagcttctgatatcacaccatcgacgaaccttactcaatccccggtccaaaataacctgctcctcaaagggtgttgcggtgttct
Black Rose	(605)	aagctgtctgtccagcttctgatatcacaccatcgacgaaccttactcaatccccggtccaaaataacctgctcctcaaagggtgttgcggttct
Cardinal	(621)	ARGETGTETETECAGETETETAACACCATEGACGAACCTTAETCAATCCCCGGTECAAAATAACCTGETECTCAAAGGTGTTGGTGCGGGEGGT
1-84 Gm Hm	(594)	ARGENETETETETETETETETETETETETETETETETETETE
M242 Hm	(591)	A A GOT GT C T GT C C A GOT T C T A C A C C A C C A C C C C C C A C
1-30 Gm Gm	(604)	aagctgtctgtccagcttctgatatcacaccatcgacgaaccttactcaatccccggtccaaaataacctgctcctcaaagggtgttgcggtttct
1-45 Gm Gm	(590)	AAGCTGTCTGTCCAGCTTCTGATATCACACCATCGACGAACCTTACTCAATCCCCGGTCCAAAATAACCTGCTCCTCAAAGGGTGTTGCGTGCG
Regent	(591)	AAGCTGTCTGTCCAGGTTCTGATATCACACCATCGACGAACCTTACTCAATCCCCGGTCCAAAATAACCTGCTCCTCAAAGGGTGTTGCGTGCG
Dornfelder	(594)	ARGCTGTCTGTCCAGCTCTGATATCACACCATCGACGAACCTTACTCAATCCCCGGTCCAAAATAACCTGCTCCTCAAAGGGTGTTGCGGTGCGGTTTCT
Müller-Thurgau	(591)	ARGETSTELESTECRACTICEGATATCACACCATEGACGAACCTTACTCAATCCCCGGTCCAAATAACTGCTGCTCCAAAGGGTGTGGGGGTGT AAGCTGCTCTGCCAACCTTCTGATTCACCCATCGACGAACCTTACTCAATCCCCGGTCCAAATAACCTGCTCCCCAAAGGGTGTGGGGGGTCT
Muskateller	(591)	AAGCTGTCTGTCCAGCTTCTGATATCACACCATCGACGAACCTTACTCAATCCCCGGTCCAAAATAACCTGCTCCTCAAAGGGTGTTGCGTGCG
Riesling	(591)	aagetgtetgteegeetetgatategeaceaecegaecettaetegageecegaaataaecetgeteetgaagggtgttgegggttet
Dunkelfelder	(593)	aagctgtctgtccagcttctgatatcacaccatcgacgaaccttactcaatccccggtccaaaataacctgctcccaaagggtgttgcggttct
Traminer rot	(592)	ARGETGTETETCAGETETETAACACCATCGACGAACCTTACTCAATCCCCGGTCCAAAATAACCTGCTCCCAAAGGGTGTTGCGTGCG
Felicia	(593)	ARGELGEEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEG
Grauburgunder	(591)	AAGCIGICIGICCAGCIICIGATATCACACCAICGACGAACCIIACICAATCCCCGGICCAAAATAACCIGCICCICAAAGGGIGIIGCGGIGCGG
Portugieser	(604)	aagctgtctgtccagcttctgatatcacaccatcgacgaaccttactcaatccccggtccaaaataacctgctcctcaaagggtgttgcgggttct
Schwarzriesling	(593)	aagctgtctgtccagcttctgatatcacaccatcgacgaaccttactcaatccccggtccaaaataacctgctcccaaagggtgttgcggtttct
Dakapo	(590)	AAGCIGTCTGTCCAGCTTCTGATATCACACCATCGACGAACCTTACTCAAAACGGTCCAAAATAACCTGCTCCTCAAAGGGTGTTGCGTGCG
St. Laurent Villaria	(593)	ARGELETETETETETETETETETETETETETETETETETETE
18 Gm Gm	(593)	AGCTGTCTGTCCAGCTTCTGATATCACACCATCGACGAACCTTACTCAATCCCCGGTCCAAAATAACCTGCTCCTCAAAGGGTGTTGCGTGCG
18 Gm Hm	(593)	abscrutcretccascrttcreatatcaccatcgacgaaccttactcaatccccggtccaaaataacctgctcctcaaagggtgttgcgtgcg
INRA 777 Gm	(591)	AAGCTGTCTGTCCAGCTTCTGATATCACACCATCGACGAACCTTACTCAATCCCCGGTCCAAAATAACCTGCTCCTCAAAGGGTGTTGCGTGCG
54 Gm Gm	(591)	AAGCTGTCTGTCCAGCTTCTGATATCACCATCGACGAACCTTACTCAATCCCCGGTCCAAAATAACCTGCTCCTCAAAGGGTGTTGCGTGCG
		801 900
narsievelue Arbane	(694)	AT ACCOUNT CONCENTERATION AND THE SECTION OF THE SECTION AND A SECTIONAL AND A SECTION
Koshu	(694)	ATACCCGCCTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATTGCCAGCACCATAGGGAGAGTAGTAGTAGCAGTGGTAGCA
Räuschling	(693)	ataccccccccccagcttcagctgattccggtgttttggctccgcaaaaatggcgatggcgatggcgatgggagagaagaagaagtagtagtagtagtagta
Black Rose	(705)	ATACCCGCCTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGGTGTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATGGCGATGGCGAGCAGCATAGGGGAGTAGTAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
Lardinal	(721)	
1-84 Gm Hm	(694)	ATACCCGCCTCCAGCTTCAGCTGATTCGGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATGCGCAGCAGCAGCAGCAGTAGGAGGAGTAGTAGCAGTGGTAGCA
M242 Hm	(691)	ATACCCGCCTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATGCGCAGCAGCAGCAGGAGGAGTAGTAGCAGTGGTAGCA
1-30 Gm Gm	(704)	ATACCCGCCTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATGGCGAGCAGCAGCAGGAGGAGTAGTAGCAGTGGTAGCA
1-45 Gm Gm	(690)	ATACCCGCCTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATGGCGATGGCGAGCAGCAGCAGGAGAGAGTAGTAGCAGTGGTAGCA
Regent	(691)	AT ACCUGUCI CUASU FTCAGOTGATTCCGGTGTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATGCCAGCAATAGGGCGAGCAAGAGTAGCAGTGGCAGGAGAAGTAGCAGTGGCAAGAA
Dornfelder	(694)	AT RECONSIDE TO CARE TO AN TO USE OF THE OSCI CONCARARATE DO COME TO COME TO COME ACCALLADGE ADDATE AND A ACCADED TO CARE AND A TO
Müller-Thurgau	(691)	ATACCC6CCTCCA6CTTCA6CT6ATTCC6GTGTTTTG6CTCC6CAAAAATG6CGAT6GCGAT6GCGAT6GCGATA6CGAC6CTAGGGAGAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTA
Muskateller	(691)	ATACCCGCCTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATGGCGAGCAGCAGCAGCAGAGTAGTAGCAGTGGTGGTAGCA
Riesling	(691)	ATACCCCCCTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATGGCGAGCAGCAGCAGGAGAGTAGTAGCAGTGGTAGCA
Dunkelfelder	(693)	ATACCCGCCTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATGGCGATGGCGAGCACGCATAGGGAGAGTAGTÀGCAGTGGTGGTAGCA
Traminer rot	(692)	ALACCUGUE TCLAGET TCLAGETGATTCCGGETGITTTGGGTCCGCAAAAAATGGCGATGGCGATGGCGATGGCGACAGCATAGGGAGAGTAGTAGCAGTGGTAGCA DTDCCGCGTCCGAGCTTCCAGTGATTCCGGTGTTTTGGGTCGGCAAAAAATGGCGATGGCGATGGCGATGGCGACAGCGATAGGGAGAGAGTAGTAGCAG
Felicia	(693)	ATACCCGCCTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGTGTTTTGGCTCCGCAAAATGGCGATGGCGATGGCGATGGCGACATAGGGGAGATAGTAGGAGATAGTAGGAGATAGTAGG
Grauburgunder	(691)	ATACCCGCCTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATGGCGATGGCGATAGGGAGAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAG
Portugieser	(704)	ATACCCGCCTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATTGCGCAGCAGCATAGGGAGAGTAGTAGCAGTGGTAGCA
Schwarzriesling	(693)	ATACCCGCCTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATGGCGAGCAGCAGCAGCAGAGGAGAGTAGTAGCAGTGGTGGTAGCA
Dakapo	(690)	AT ACCUGUCI CLARGETTCAGOTGATTCCGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGCATGGCGATGGCCAGCAATAGGGAGAGTAGTAGCAGTGGTAGCA
JL. Laurent Villaria	(693)	TACCCCCCCCCCCCCCCTCASCTATTCCCCCCTTTTGCCTCCCCAAAAATGCCCATGCCATGCCACCCCACAGCAGCACACAGCAGCACACAGCAGCACACAGCAG
18 Gm Gm	(693)	ATACCCGCCTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATTGCCAGCAGCACCATAGGGAGAGTAGTAGCAGTGGTAGCA
18 Gm Hm	(693)	atacccgcctccagcttcagctgattccggtgttttggctccgcaaaatggcgatggcgattgcgcagcagcagcatggggagtagtagcagtggtggtag
INRA 777 Gm	(691)	ATACCCGCCTCCASCTTCASCGCTGATTCCGGTGTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATGGCGACGCAGCATAGGGAGAGTAGTAGCAGTGGTGGTAGCA
54 Gm Gm	(691)	ATACCCGCUTCCAGCTTCAGCTGATTCCGGTGTTTTGGCTCCGCAAAAATGGCGATGGCGATGCGCAGCAGCAGCAGGAGAGTAGTAGCAGTGGTAGCA

		901 1000
Harslevelue	(794)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark> G
Arbane	(794)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark> GT
Koshu	(794)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA
Räuschling	(793)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAAATATG
Black Rose	(805)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATA</mark>
Cardinal	(821)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGAAAATATGTGCGGTACACCGCA
1-84 Gm Gm	(794)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATA</mark>
1-84 Gm Hm	(794)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATA</mark>
M242 Hm	(791)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGG <mark>AAAATAT</mark> G
1-30 Gm Gm	(804)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark> GTGCGGTACACCGC
1-45 Gm Gm	(790)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark>
Regent	(791)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark>
Dornfelder	(794)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>A</mark>
Kerner	(791)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark>
Müller-Thurgau	(791)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA
Muskateller	(791)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark>
Riesling	(791)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark>
Dunkelfelder	(793)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGG <mark>AAAATAT</mark>
Traminer rot	(792)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark>
Silvaner	(793)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGG <mark>AAAATAT</mark>
Felicia	(793)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATA</mark>
Grauburgunder	(791)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark>
Portugieser	(804)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark> GTGCGGTACACCGC
Schwarzriesling	(793)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATA</mark>
Dakapo	(790)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATA</mark>
St. Laurent	(793)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGG <mark>AAAATAT</mark>
Villaris	(794)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATA</mark>
18 Gm Gm	(793)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark>
18 Gm Hm	(793)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark>
INRA 777 Gm	(791)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark>
54 Gm Gm	(791)	TCAACAAGCATCTTGACTCCGGA <mark>AAATAT</mark>

9.5 Sequenzen für das Kandidatengen bZiP

		1 100
1-84 Gm Gm Allel 1	(1)	TG TA AACGACGGCCAG TTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTG TTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTTAAATTATCTTCT
1-84 Gm Hm Allel 1	(1)	TG TAAA CGACGGCCAG TTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTG TTTTAACTAATTTTTTTTAAACTCTATTATTTAAAATTATCTTCT
1-30 Gm Gm Allel 1	(1)	TGTAAACGACGGCCAGTTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTTAACTAATTTTTTTT
1-45 Gm Gm Allel 1	(1)	TGTAAACGACGGCCAGTTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTTAACTAATTTTTTTT
18 Gm Hm Allel 1	(1)	TGTAAACGACGGCCAGTTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTTAACTAATTTTTTTT
Inra 777 Hm Allel 1	(1)	TGTAAACGACGCCAGTTCTTCAAGTTTCCACTACAAAGTGTTTTAACTAATTTTTTTT
Inra 777 Gm Allel 1	(1)	T G T A A ACGACGGCCAG TT CTT CA AGT TT CCACT ACA AAGTG TT TT AACTA ATT TT TT TT AAACT CTA TT ATT TA AATT TATCT TCT
1-84 Gm Gm Allel 2	(1)	TGTA & & CGACGGCCAGTTCTCA AGTTCCA CTACA && GTGTT TTAACTA ATTTTTTTTAAACTCTTA TATTTA AATTATCTTCTA & AATTTTAA & AA
1-30 Gm Gm Allel 2	(1)	TGTA & & COROCCEGETCETCE AGETTCCE CERCE & AGEGETTTALCE & ATTETTTE A ALCOCTE TATETA ANTETCE AGETTCE A ALTOTCE A
18 Gm Gm Allel 2	(1)	TGT & & COROCCERTICITICS SETTICE CONCERNS & SETETITES CONTENT TO A SET TATES AND THE CONTENTS & SETTITES AND THE
Taxa 777 Cm Allol 2	(1)	
Infa /// Gm Affel 2	(1)	I STARA CARCAGO CASTI CITCARASTI CORTAGARANOSTI TIRACI CATI TITI TARACI CIATTATI TARATI DI CITARASTI TIRARANO
Inia /// hm Allel 2	(1)	191880-990-990 II OTI GRADI II OGO FRANKISI II IARO IRATI II II II II RAKU OTATARI IRATI II OTO RAKI II IRAKAG
		101 200
1-84 Gm Gm Allel 1	(101)	A A T T T CA AAA ACATA TA AAGAA ACA AA GTG TT TTG AA ACCGA TA CTAGT AA AGGAAG CCAACCCTTT AA AAGGGAGA AAA TA TCT TAATA TA TTT AT AA
1-84 Gm Hm Allel 1	(101)	<mark>a a tittea aa acata ta aagaa aca aagtg tittga aacega ta ctagtaa aggaagee aacee titaa aagggaga aaa ta tettaa ta titta taa</mark>
1-30 Gm Gm Allel 1	(101)	A A T T T CA AAA AC ATA TA AAGAA ACAA AGTG TT TTGAA ACCGA TA CTA GT AA AGGAAGCCAACCC TTT AA AAGGGAGA AAA TA TCT TA ATA TA TTT AT AA
1-45 Gm Gm Allel 1	(101)	A A T T T CA AAA ACATA TA AAGAA ACAAA GTG TT TTG A AACCGA TA CTA GTAAA GG AAGCCAACCC TTTA A AAGGG AGA AAA TA TCT TA ATA TA TTT ATAA
18 Gm Hm Allel 1	(101)	A A T T T CA AAA ACATA TA AAGAA ACAAA GTG TT TTGA AACCGA TA CTA GTAAA GGAAGCCAACCC TTTA A AAGGGAGA AAA TA TCT TAATA TA TTT ATAA
Inra 777 Hm Allel 1	(101)	A A T T T CA AAA ACATA TA AAGAA ACAAA GTG TT TT GA AACCGA TA CTA GT AAA GG AAGCC AACCC TT TA A AAGGG AGA AAA TA TCT TA ATA TA TT T A TA
Inra 777 Gm Allel 1	(101)	A A T T T CA AAA ACATA TA AAGAA ACRAA GTG TT TTG A ACCGA TA CTA GT AAA GG AAGCCAACCC TTT AA AAG GG AGA AAA TA TOT TA ATA TA TTT AT AA
1-84 Gm Gm Allel 2	(101)	A A T T T CA AAA AC ATA TA AAGAA ACRAAGTG TT TTGA AACCGA TA CTA GTAAA GGAAGCCAACCCTTTAA AAGGGAGA AAA TA TCT TAATA TA TTT ATAA
1-30 Gm Gm Allel 2	(101)	a a titte a sa se sta ta sa ca sa sa creatitue a secora ta eta casa eccasere asece tita a sacesa ca sa ta tetta ta teta ta
18 Gm Gm 211e1 2	(101)	A A TATATA ANA NA TANA NA ANA ANA ANA AN
Inva 777 Cm Milel 2	(101)	
Inra 777 Wm Allel 2	(101)	ал і і і салавлюца навазавани на ті і і і саласта на сталя саласованости со і і і валасованали в і сі і вліна і і і і і а 1 ататорі з за солати та за слад за слад кототото за кото стала стала со за состат за за состат за заста за тат
inia /// im Ailei z	(101)	AAT 1 1 1 UMAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
		201 300
1-84 Gm Gm Allel 1	(201)	201 3 T A GG A A TTA GA GTA AT TAA GA GGA AT ATTA AT ATTATA A GGGAA TGGGA GGAGGAGA AA TGG A A TACTA AATTAA AGA AAGAA TATAA ATTATTATATTA
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1	(201)	201 A TAAGAAA TTAGA GTA AT TAAGA GGA AT ATAAT ATT AA AGGAA TGGCA CGAGGAGAGAA A TGA AA TACTA AAT AA AGA AAGAA TAT AA ATT TT ATT TT AT A TA A GA AA TTAGA GTA AT TAA GA GGA AT ATTAA A AGGAA TGGCA CGAGGAGAGA AA TGA AA TACTA AAT AA AGA AAGAA TAT AA AT
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1	(201) (201) (201)	300 B TARGRAR TERGEGERAT TERGEGERAT REAL ATT ARAGGER TGGCE CORGEGERGERE TGERE TGERE TREAM TREAM ARGEREGER TAT ARACT TETT TETT TETT B TARGRAR TERGEGERAT TERGEGERAT REAL ATT ARAGGER TGCCE CORGEGERGERE TGERE TGERE TREAM TREAM ARGEREGER TAT ARACT D TREAM DE TERGE TO TERGE GENE TETTE DE TOTT TO TAT
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1	(201) (201) (201)	300 A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAATATT AAAGGAA TGGCACGAGGAGAAA TGAAA TACTAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATTAATATT AAAGGAAT GGCACGAGGAGAAA TGAAA TACTAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATTAATATT AAAGGAAT GGCACGAGGAGGAGAAT TGAAA TACTAAATTAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATTAATATT AAAGGAAT GGCACGAGGAGGAGAAA TGAAA TACTAAATTAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATTAATATTAAAGGAAT GGCACGCAGGAGGAGAAAT TGAAATTACTAAATTAAAGAATAACAACAATTAAATT TTATT TTAT
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1	(201) (201) (201) (201) (201)	300 A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAAT ATTAAAGGAA TGGCA COAGGAGAGAAA TGAAA TAC TAAAT AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAAT ATTAAAGGAA TGGCA COAGGAGAAAA TGAAA TAC TAAAT AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATTAATATTAAAGGAAT GGCA COAGGAGGAGAAA TGAAA TAC TAAAT AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATTAAT ATTAAAGGAAT GGCA COAGGAGGAGAAA TGAAA TAC TAAAT AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAAT TAGAGTAAT TAAGA GGAAT ATTAAT ATTAAAGGAAT GGCA COAGGAGGAGAAA TGAAAT GAAATAAGAAAGAATAAAGAAATTAAATT TTATT TTAT A TAAGAAAT TAGAGTAAT TAAGGAAT ATTAAT ATTAAAGGAAT GGCA COAGGAGGAGAAAT GAAAT TACTAAATTAAAGAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAAT TAGAGTAAT TAAGA GGAAT ATTAAT ATTAAAGGAAT GGCA COAGGAGGAGAAAT GAAAT TACTAAATTAAAGAAGAAT TATAATT TTATT TTAT
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1	(201) (201) (201) (201) (201)	300 BTARGARATTAGAGTAAT TARGAGGAAT ATAAT ATT AR AGGAA TGGCA CGAGGAGAGAAA TGA AAT TAA AGAAGGAATAAAAT TT TATT TTAT BTARGAAA TTAGAGTAAT TARGAGGAAT ATTAAT ATT ARAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAA TGA AAT TAA GAAGGAATAAAAT TT AATT TTATT TTA BTARGAAA TTAGAGTAAT TARGAGGAAT ATTAAT ATT ARAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAA TGA AAT AC TAAATAAAGAAGGAATAAAATT TTATT TTAT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TARGAGGAAT ATTAATATT ARAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAA TGA AATAC TAAATAAAGAAGAATAAAATT TTATT TTAT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TARGAGGAAT ATTAATATT ARAGGAAT GGCA CGCAGGAGGAGAAAT GGAAT AC TAAATAAAGAAAGAATATAAATT TTATT TTAT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TARGAGGAAT ATTAATATT ARAGGAAT GGCA CGCAGGAGGAGAAAT GGAAT AC TAAATAAAGAAAGAATATAAATT TTATT TTAT ATAAGAAATTAGAGTAAT TARGAGGAAT ATTAATATTAAAGGAAT GGCAC CGCAGGAGGAGAAAT GGAAT AC TAAATAAAGAAAGAATATATATATATATT TAAT
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1	(201) (201) (201) (201) (201) (201)	300 A taagaaa ttaga gtaat taaga ggaat ataat att aa aggaa tggca csaggag agaa tgaaa tgaat aa agaaagaa tat aa att aa ttaga tta att att
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 1	(201) (201) (201) (201) (201) (201) (201)	300 A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAAT ATT AAAGGAA TGGCA CGAGGAGGAGAAA TGAAA TAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATTAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAA TGAAAT CAAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCACGAGGAGGAAAT GAAAT CAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATTAAT ATT AAAGGAAT GGCACGAGGAGAAAT GAAAT AGAAAAGAAT AATAAAGAAAGA
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 2	(201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201)	300 A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAATATT AAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAA TGAAA TACTAAAT AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAG AAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAATATT AAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAA TGAAA TACTAAAT AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAG AAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAATATT AAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAA TGAAA TACTAAATT AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAATATAT AAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAAA TGAAA TACTAAATT AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAATATAT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAA TGAAA TACTAAATA AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAATATAT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAA TGAAA TACTAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAATATT TAAAGGAAT GGCA CGAGGAGAGAAAT GAAA TACTAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAATATAT TAAAGGAAT GGCA CGAGGAGAGAAA TGAAA TACTAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAAA TGAAA TACTAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGGAAA TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAATAT TTAATATATAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAAA TGAAA TACTAAATATAAAGAAATATAAATT TTATT TTAT
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 2 1-30 Gm Gm Allel 2	(201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201)	300 BY ARG RANTTAGE GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGGCA CGAGGAGAGAR TGARAT TGATA TARGARGAR TATAARTT TATT TTAT BY ARG RANTTAGE GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGAGAR TGARAT TGATAT ARAGARGAR TATAARTT TTATT TTAT BY ARG RANTTAGE GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGAGAR TGARAT TGATATAARTT ARAGARGAR TATAARTT TTATT TTAT BY ARG RANTTAGE GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGAGAR TGARAT TGARAT TGATAARAGARGAR TATAARTT TTATT TTAT BY ARG RANTTAGE GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGAGARAT GARAT TGATAT ARAGARAGAR TATAARTT TTATT BY ARG RANTTAGE GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGAGARAT GARAT TGATAT TARAGARAGAR TATAARTT TTATT BY ARG RANTTAGE GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGAGARAT GARAT TGATAAT ARAGARAGAR TATAARTT TTATT TTAT BY ARG RANTTAGE GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGGAGARAT GARAT TGATAAT ARAGARAGAR TATAARTT TTATT TTAT BY TARG RANTTAGE GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGGAGARAT GARAT TGAT ARAGARAGAR TATAARTT TTATT TTAT BY TARGARATTAGE GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGAGARAT GARAT TGATAAT TARAGARAGAR TATAARTT TTATT TTAT BY TARGARAT TGGA GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGAGARAT GARAT TGAT TATAARATAA TARAGARAGAR TATAARTT TTATT TTAT BY ARG GRAAT TTAGE GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGAGARAT GARAT TAC TARAT TARAGARATAT TARATT TTATT TTATT BY ARG GRAAT TTAGE GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGARAR TGARAT TAC TARAT TAT ARAGARAT ATAARTT TTATT TTATT BY TARGARAT TGGA GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGARAR TGARAT TACTAAT TACTAATAT ARAGARAT ATTAAT TTATT TTATT TTATT BY ARG GRAAT TTAGE GTART TARGE GGRAT ATAAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGARAR TGCAA TACTAAT TACTAATAT ARAGARAGAR TATAAATT TTATT TTATT BY ARG GRAAT TTAGE GTART TARACT ATTA ATTAT ATT ARAGGAR TGCCA CGAGGAGARAR TGCAA TACTAAT TACTAAT ARAGARAGAR TATAAATT TTATT TTATT BY ARG GRAAT TTAGE GTART TARACT ATTAT ATTAT ATTATAT ATTATA A TTATATT ATTATT
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 2 1-30 Gm Gm Allel 2 18 Gm Gm Allel 2	(201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201)	300 A taagaaa ttaga gtaat taaga ggaat ataat att aaaggaa togca csaggagagaaa tgaaa tac taaat aaggaaggaa tat aa tt taat ttaat tt tatt ttatt ttat A taagaaa ttaga gtaat taaga ggaat ataat att aaaggaa togca csaggagagaaa tgaaa tac taaat aaggaaggaa tat aaatt ttatt ttatt ttat A taagaaa ttaga gtaat taaga ggaat ataat att aaaggaa togca csaggagagaaa tgaaa tac taaat aa ggaaggaa tat aaatt ttatt ttatt ttat A taagaaa ttaga gtaat taaga ggaat ataat att aaaggaa togca csaggagagaa tgaaa tac taaat aa ggaagagaa tat aaatt ttatt ttatt ttatt A taagaaa ttaga gtaat taaga ggaat ataat att aaaggaa togca csaggagagaa tgaaa tac taaat aa ggaagagaa tat aaatt ttatt ttatt ttat A taagaaa ttaga gtaat taaga ggaat ataat att aaaggaa togca csaggagagaa tgaaa tac taaat aa ggaagagaa tat aaatt ttatt ttatt ttat A taagaaa ttaga gtaat taga ggaat ataat att aaaggaa togca csaggagagaaa tgaaa tac taaat aa ggaagagaa att aaatt ttatt ttatt ttat A taagaaa ttaga gtaat taga ggaat ataat att aaaggaa togca csaggagagaa tgaaa tac taaat aa ggaagagaa attaaatt ttatt ttatt ttat A taagaaa ttaga gtaat taga ggaat ataat att taaaggaa togca csaggagagaa tgaaa tac taaat aa ggaagaa ata aaatt ttat att taat tt taat ttat A taagaaa ttaga gtaat taaga ggaat ataat at taa at taa aggaa togca csaggagagaa tgaaa tac taat taagaa aagaa ta aaatt ttaa tt taa tt taat tt taat ttat ttat A taagaaa ttaga gtaat taaga ggaat ataa tat taat ttaa aggaa togca csaggagagaa tgaa tac taaat aa kagaaagaa tat aaatt ttat ttat
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 2 1-30 Gm Gm Allel 2 18 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2	(201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201)	300 A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAA TGGCA CGAGGAGAGAAA TGAAA TGAAAT AAAGAAGAA TATAAGAT TTATAT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAA TGGCA CGAGGAGGAAA TGAAAT CATAAAT AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAA TGGCA CGAGGAGGAAAT GAAAT CATAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAA TGGCA CGAGGAGGAAAT GAAAT CATAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAAT GAAAT CATAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTATT A TAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAAT GAAAT TCATAATAAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTATT A TAAGAAAT TTAGAGTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAAT GAAAT TCATAATT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAAT TTAGAGTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAAT GGAAAT CATAAATA AAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAAT TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAT GGAAAT TGAAATAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAAT TTAGAGTAAT TAAGA GGGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAT GGAAAT TGAAAT AAATAAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAAT TTAGAGTAAT TAAGA GGAAT ATTAAT TTA AAGGAAT TGCCA CGAGGAGGAGAAAT TGAAAT AATAAAAGAAAGAAT ATAAATT TTATT TTATT A TAAGAAAT TTAGAGTAAT TAAGA GGAAT ATTAAT TTAAT TAAAGGAAT TGCCA CGAGGAGAGAAAT TGAAAT AAGAAT AAAGAAAGAAT ATAAATT TTATT TTATT A TAAGAAAT TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATTAAT TTAAT TAAAT GCCA CGAGGAGGAGAAAT TGAAAT ACTAAATAAAGAAT AATAATAATT TTATT TTATT TTAT A TAAGAAAAT TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATTAATT TTAT TTATT TTAT A TAAGAAAT TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATTAAT TTAAT TAAGAAT GGCA CGAGGAGAAAT TGAAAT TACTAAATAATAAAATAT TTAATT TTATT TTATT A TAAGAAAT TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATTAATT TTATT TTATT TTATT A TAAGAAAT TTAGAGTAAT TAAGAGGAAT ATTAATTA
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 2 1-30 Gm Gm Allel 2 1-30 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 2	(201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201)	300 BY ARGAAR TYAGA GYAAT YAAGA GGAAT AYAAT AYY ARAGGAR YGGCA CGAGGAGAGAA YGAA TACYAAT ARGAAAGAA YAAGAAGAY YAAAGYAAY BY ARGAAR TYAGA GYAAT YAAGA GGAAT AYYAAT AYY ARAGGAR YGGCA CGAGGAGAGAA YGAA TACYAAGA YAYAAGAA YAAGAAY BY ARGAAR YYAGA GYAAY YAAGA GGAAT AYYAAT AYY ARAGGAR YGGCA CGAGGAGAGAA YGAA TACYAAT AYYAA ARGAAAGAY YAYAAYY BY ARGAAR YYAGA GYAAY YAAGA GGAAT AYYAAT AYYAAAGGAR YGGCA CGAGGAGAGAA YGAA TACYAAT AN AGAAAGAA YAYAAYY BY ARGAAR YYAGA GYAAY YAAGA GGAAT AYYAAT YYYAAAGGAR YGGCA CGAGGAGAGAA YGAA TACYAAAY ARAGAAAGAA YAYAAAYY YAAAGAA YYAGA GYAAY YAAGA GGAAT AYYAAT YYYAAAGGAA YGCA CGAGGAGAGAAA YGAAY TACYAAAY AAAGAAAGAA YAYAAYY YAAAGAAA YYAGA GYAAY YAAGA GYAAY YYYAYAYYYA YAYAYYAY YAYAAGAA YAAYAAYAA YAYAAYYAYAYYAY YAYAYYAYAYYAY
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 2 1-84 Gm Gm Allel 2 18 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 2	(201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201)	300 A targara tirga gitant targa ggart atart att araggar tgcca csagsagara tgrar tgrar targaragar tarang tit att tart tit att transformer and transformer and transformer and the targar targar targa ggart atart att araggar tgcca csagsagar tgcar tgrat targaragar targar attar argaragar targar targa ggart atart att targagar tgcca csagsagar tgart tgart targar attar argar attar argar attar argar attar attar attar argar to cca csagsagar transformer argar attar attar attar argar tgcca csagsagar tgart targar targar attar argar attar argar attar attar argar attar attar argar attar argar attag argar to cca csagsag argar attar to tart targar attar argar attar argar attar argar argar attar attar argar attar argar attag argar tit argar attar argar attar argar attar attar argar attar argar attar argar attar argar attar argar attar argar attar attar attar argar attar argar attar argar attar argar attar attar argar attar argar attar argar attar attar argar attar argar attar argar attar attar attar argar attar argar attar argar attar argar attar attar attar argar attar attar argar attar argar attar attar argar attar attar attar argar attar attar attar argar attar argar attar argar attar argar attar attar attar attar argar attar argar attar argar attar argar attar argar attar attar attar attar argar attar argar attar argar attar argar attar attar attar attar argar attar argar attar argar attar attar attar attar argar attar argar attar attar a
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 2 1-30 Gm Gm Allel 2 18 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 2	(201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201)	201 300 A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAA TGAAA TGA TAA TAAAGAAAGAA TTAAGA ATTAT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATTAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAA TGAAA TGA TAACTAAAGAAAGAA TAAAATTT TATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAATAT ATAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAA TGAAA TGA TAC TAAATAAAGAAAGAA TATAAATTT TATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAATAT ATAAGGAA TGGCA CGAGGAGGAAA TGAAA TGA TAC TAAATAAAGAAAGAA TATAAATTT TATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAA TGAAA TGA TAC TAAATAAAGAAAGAA TATAAATTT TATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAA TGAAA TGA TAC TAAATAAAGAAAGAA TATAAATTT TATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAAA TGAAA TAC TAAATAAAGAAAGAA TATAAATTT TATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAGAAA TGAAA TAC TAAATAAAGAAAGAA TATAAATTT TATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAGAAA TGAAA TAC TAAATAAAGAAAGAA TATAAATTT TATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAAA TGAAA TAC TAAATAAAAAAAGAAATAAAATTAAATT
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 2 1-84 Gm Gm Allel 1	(201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201)	201 300 DIARAGAA TIAGAGITAAT TAAGA GGAAT ATAAA TATAAA SGAA TGGCA CGAGGAGAGAAA TGAAA TACTAAATAAAGAAGAA TAAAATATTAATT TATATTAA TAAGAAA TIAGAGITAAT TAAGA GGAAT ATAAATATTAAASGAA TGGCA CGAGGAGAGAAA TGAAATACTAAATAAAGAAAGAA TAAAATTAAATT
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 2 1-84 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1	(201) (201)	201 300 RTARGRAN TTAGA GTAAT TARGA GGAAT ATAATTATA AAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGA TGAATATCA TAATAAAGAAGAATATAAATTATTATTATTATTATA RTARGAAA TTAGA GTAAT TARGA GGAAT ATAATTATA AAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAT GGAATACTAAATTAAAGAAGAATATAAATTATATTAT
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 2 1-84 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 2 1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-80 Gm Gm Allel 1	(201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (201) (301) (301)	201 300 A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAA TGAAAT CTAAAT AAAGAAAGAA TATAAAT TTATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAA TGAAAT CTAAAT AAAGAAAGAAT ATAAAT TTATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAAT GAAAT ACTAAAT AAAGAAAGAAT ATAAAT TTATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAAT GAAAT ACTAAAT AAAGAAAGAAT ATAAATT TATT T
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 2 1-30 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 2 1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1	(201) (201)	201 300 A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATTAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAA TGAAAT CTAAAT AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATTAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAA TGAAAT CTAAAT AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATTAAAGGAA TGGCA CGAGGAGGAAA TGAAAT AC TAAAT AAAGAAAGAA TAAAAT TAAGAT TTATT TATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATTAAAGGAA TGGCA CGAGGAGGAGAAA TGAAAT AC TAAATAAAGAAAGAA TAAAAT TAAATT TAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAGAAA TGAAAT AC TAAATAAAGAAAGAA TAAAAT TAAGAT TTATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAATAT TAAAGGAAT GGCA CGAGGAGAGAAA TGAAAT AC TAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTATT A TAAGAAAT TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAATAT TAAAGGAAT GGCA CGAGGAGAGAAA TGAAA TAC TAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTATT A TAAGAAAT TAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAATAT TAAAGGAAT GGCA CGAGGAGAGAAA TGAAA TAC TAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTAAT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAATAT TAAAGGAAT TGGCA CGAGGAGAGAAA TGAAA TAC TAAATAAAGAAAAGA
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 2 1-80 Gm Gm Allel 2 10 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-36 Gm Hm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1	(201) (201)	201 300 NTARGARATTAGA GTAATTAGA GGAATATAATATTAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAA TGAAATCAAAATAAAGAAAGAATAAAAAAAAAA
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 2 1-84 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 1 S Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1	(201) (201)	201 300 A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAA TGAAAT CTAAAT AAAGAAAGAAT TATAAAT TTATT TTATT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAAT GAAAT ACTAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAAT GAAAT ACTAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAGAAAT GAAAT ACTAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAGAAAT GAAAT TACTAAATT AAAGAAAGAAT TATAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAGAAAT GAAAT TACTAAATT AAAGAAAGAAT TATAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAGAAAT GGAAA TAC TAAATT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAGAAAT GGAAA TAC TAAATT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAGAAAT GGAAA TAC TAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAG AAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAGAAAT GGAAA TAC TAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTATT A TAAG AAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAAT GGAAA TAC TAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAG AAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAT GGAAA TAC TAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAG AAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAAT GGAAAT TAC TAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAG AAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAT GGAAAT TAC TAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAG AAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATTAT AAAGGAAT TAT T
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 2 1-30 Gm Gm Allel 2 1-80 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 10 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 1 10 Fm Hm Allel 1 10 Fm Fm Gm Allel 1 10 Fm Fm Fm Gm Allel 1 10 Fm	(201) (201)	201 300 A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAA TGAAAT CTAAAT AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAA TGAAAT CTAAAT AAAGAAAGAAT ATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGGAAAT GAAAT ACTAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAAT GAAAT ACTAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAAT GAAAT TACTAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAAT GAAAT TACTAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAAT GAAAT TACTAAAT AAAGAAAGAAT TATAAATT TTATT TTAT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATTAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGGAGAAAT GAAAT TACTAAAT AAAGAAAGAAT ATAAATT TTATT TTATT A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATTAATAT ATAAAGGAAT GGCA CGAGGAGGAAAT GGAAT ATAAAATAAA
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 2 1-84 Gm Gm Allel 2 1-80 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 11ra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 2	(201) (201)	201 300 NTARGAAR TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAAT NTTARAGGAR TGGCA CGAGGAGAGAAR TGAAR TCA TAATAAAGAAAGAA TATAAGAATATAAAT TTATT TTAT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAATAT TAAAGGAR TGGCA CGAGGAGAGAAR TGAAR TCA TAATAATAAGAAGAATATAAATT TTATT TTAT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAATAT TAAAGGAR TGGCA CGAGGAGAGAAR TGAAR TCA TAATAAGAAGAATATAAATT TAATT TTATT TTAT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAGAAR TGAAR TCA TAATAAGAAAGAA TATAAATT TATAT TTATT TTAT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAGAAR TGAAR TAC TAAATAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTATT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAGAAR TGAAR TAC TAAATA TAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTATT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAGAAR TGAAA TAC TAAAT TAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTATT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAGAAR TGAAA TAC TAAAT TAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTATT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAGAAA TGAAA TAC TAAAT TAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTATT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAGAAA TGAAA TAC TAAAT TAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTATT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAGAAA TGAAA TAC TAAAT TAAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTATT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAAA TGAAA TAC TAAAT AAAGAAAGAA TATAAATT TTATT TTATT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAATAT TAAAGGAA TGGCA CGAGGAGAAAA TGAAA TAC TAAAT AAAGAAAGAA TATAAATT ATAAGAAA TTAGAGTAAT TAAGA GGAAR TATAATAT TAAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAA TGAAA TAC TAAAT AAAGAAATAAAAAAAATAAAAT
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 2 1-84 Gm Gm Allel 2 1-80 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 1 1ra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 2 1-80 Gm Gm Allel 2 1-80 Gm Gm Allel 2	(201) (201)	201 300 NTARGRAM TRAGEGTART TARGEGGART MAATIAT TARGEGAR TEGCA CEREGAGIAGAAR TEGAATAC TAANTAARGAARGAAR TATAAATTATTATT TATT NTARGAAA TRAGEGTAAT TARGEGGART ATAATATA AREGGARTEGCA CEREGAGIAGAAR TEGAATAC TAANTA AREGAARGAATATAAATT TATT TATT NTARGAAA TRAGEGTAAT TARGE GGART ATAATATA TARAGGAR TEGCA CEREGAGIAGAAR TEGAA TAC TAANTA AREGAARGAATATAAATT TATT TATT NTARGAAA TRAGEGTAAT TARGE GGART ATAATATATA AREGGARTEGCA CEREGAGIAGAAR TEGAA TAC TAANTA AREGAARGAATATAAATT NTARGAAA TRAGEGTAAT TARGE GGART ATAATATATA AREGGAR TEGCA CEREGAGIAGAARA TEGAA TAC TAANTA AREGAARGAA TATAAATT NTARGAAGTAAT TARGE GGART ATAATATATA AREGGAR TEGCA CEREGAGIAGAARA TEGAA TAC TAANTA AREGAARGAA TATAAATT TATATTATATATATATATATATATATA
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 145 Gm Hm Allel 1 Inra 777 Hm Allel 1 Inra 777 Gm Allel 2 1-84 Gm Gm Allel 2 1730 Gm Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Hm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 1 1-85 Gm Gm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 18 Gm Hm Allel 1 19 Gm Gm Allel 1 19 Gm Gm Allel 1 19 Gm Gm Allel 1 19 Gm Gm Allel 2 19 Gm Gm Allel 2 19 Gm Gm Allel 2 19 Gm Gm Allel 2 10 Gm Gm Allel 2	(201) (201)	201 300 A TAAGAAA TTAGA GTAAT TAAGA GGAAT ATAAT ATT AAAGGAAT GGCA CGAGGAGAAAAT GGAAT ACT AAAT AAA
1-84 Gm Gm Allel 1 1-84 Gm Hm Allel 1 1-30 Gm Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 1ra 777 Gm Allel 1 1ra 777 Gm Allel 1 1ra 777 Gm Allel 2 1-84 Gm Gm Allel 2 1ra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 2 Inra 777 Gm Allel 1 1-84 Gm Gm Allel 1 1-86 Gm Allel 1 1-45 Gm Gm Allel 1 1ra 777 Gm Allel 2 18 Gm Gm Allel 2 19 Gm Gm Allel 2 10 Gm Gm Alle	(201) (201)	201 300 NTARGAAR TTAGAGTAAT TAGA GGAAT ATAAT NTTARAGGAR TGGCA CGAGGAGAGAA TGAAAT CATAAATAAAGAAGAA TATAAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAAT
		401 500
----------------------	----------------	---
1-84 Gm Gm Allel 1	(401)	A CAAA T GT CAAAGATT TAGCAAA T TT GCCACAT T TT T C TTA T GAAGT <mark>T CT CT T</mark> AC T TT CT T TAAT T TC AA T <mark>T G C</mark> AAAT AAT AT T T T AT T TG GT AAGT CCA
1-84 Gm Hm Allel 1	(401)	[,] ACAAATGTCAAAGATTTAGCAAATTTGCCACATTTTTCTTATGAAGT <mark>TCTCTT</mark> ACTTTCTTTAATTTCAATT <mark>G</mark> GAAATAATATTTTATTTGGTAAGTCCA
1-30 Gm Gm Allel 1	(401)	[,] ACAAATGTCAAAGATTTAGCAAATTTGCCACATTTTTCTTATGAAGT <mark>TCTCTT</mark> ACTTTCTTTAATTTCAATT <mark>GG</mark> AAATAATATTTTATTTGGTAAGTCCA
1-45 Gm Gm Allel 1	(401)	ACAAA TGTCAAAGATT TAGCAAA TTTGCCACAT TTT TCTTA TGAAGT <mark>T CTCTT</mark> ACTTTCT TTAAT TTCAAT <mark>TGC</mark> AAATAATAT TTTAT TTGGTAAGTCCA
18 Gm Hm Allel 1	(401)	ACRAATGICAAACATTIRGCAAATTICCCACATITITCTIRIGAACHICTCTTACTITCTITAATTICAATTGAAATAATATTITATTI
Inra /// Hm Allel 1	(401)	ACAMPIG CARDENT FROM AN ITTOCCACATITIC CONTRACTOR OF CONTROL TO TACTITICAL TO AN ANALY AND A THE ATTAC A THE ACT OF A A A A A A A A A A A A A A A A A A
1-94 Cm Cm Allel 1	(401)	
1-84 Gm Gm Allel 2	(400)	
18 Gm Gm Allel 2	(399)	
Inra 777 Gm Allel 2	(399)	A CARA TOTOLA AGATT TAGONAL ATTICCOCOCT TITICTA TONALS ACTITICTAL TOTAL TOTAL AGATATAT TITICTAL ATTICAL
Inra 777 Hm Allel 2	(399)	acaaatgicaaagati tagcaaatitigccacatitii citaigaagiactiticiitaatitcaatgiaaataatatititatitiggtaagicca
		501 600
1-84 Gm Gm Allel 1	(501)	CTCACTARGARGT TTCCTTGAAAGATTCAAGAT TTTAGGSTGTCCACCAAACTATTGGAT <mark>A</mark> TCTGGAAGGCCTTA TCCTCTATAAAGAGCATA TTTCAGA
1-84 Gm Hm Allel 1	(501)	CTCACTAAGAAGTTTCCTTGAAAGATTCAAGATTTTAGGTGTCCACCAAACTATTGGAT <mark>A</mark> TCTGGAAGGCCTTATCCTCTATAAAGAGCATATTTCAGA
1-30 Gm Gm Allel 1	(501)	CTCACTAAGAAGTTTCCTTGAAAGATTCAAGATTTTAGGGTGTCCACCAAACTATTGGAT <mark>A</mark> TCTGGAAGGCCTTATCCTCTATAAAGAGCATATTTCAGA
1-45 Gm Gm Allel 1	(501)	CTCACTAAGAAGTTTCCTTGAAAGATTCAAGATTTTAGGTGTCCACCAAACTATTGGAT. <mark>A</mark> TCTGGAAGGCCTTATCCTCTATAAAGAGCATATTTCAGA
18 Gm Hm Allel 1	(501)	CTCACTAAGAAGTTTCCTTGAAAGATTCAAGATTTTAGGGTGTCCACCAAACTATTGGAT <mark>A</mark> TCTGGAAGGCCTTATCCTCTATAAAGAGCATATTTCAGA
Inra 777 Hm Allel 1	(501)	CTCACTAAGAAGT TICCT TGAAAGAT TCAAGAT TITAGGST GTCCACCAAACTAT TGGAT ATOTGGAAGGCCT TATCC TCTATAAAGAGCATA TITCAGA
Inra 777 Gm Allel 1	(501)	CTCACTAAGAAGT TICCT NGAAGAT TICAAGAT TITAGGT GTCCACCAAACTAT NGGATATCTGGAAGGCCT TA NCCTCTATAAAGAGCATA TITAGGT GTCCACCAAACTAT NGGATATCTGGAAGGCCT TA NCCTCTATAAAGAGCATA TITAGG
1-84 Gm Gm Allel 2	(494)	CICACITA GAAGITTEETTEAAAGATTEAAGATTEAAGATTITAGGITEETEETEETEACAACIATTEGAAGGEETTATECTETATAAAGAGATATTITAGG
19 Cm Cm Allel 2	(494)	O FOR CLANDRAGT FICCI TRANSPORT FOR THE ADDRESS OF CONCERNMENT AT TOOR TO THE ADDRESS OF THE TO THE AT ADDRESS AND A THE THE ADDRESS ADDR
In ra 777 Gm Allel 2	(493)	
Inra 777 Hm Allel 2	(493)	CTCACTAAGAAGT TICCT TGAAAGAT TCAAGAT TIT AGGST GTCCACCAAACTAT TGGAT GTCTGGAAGGCCT TA TCC TCTATAAAGAGCATA TIT CAGA
	(120)	
		601 700
1-84 Gm Gm Allel 1	(601)	ACTO CLARACTICCCCCCCCCTCTCTCGGTTCCCCCGGTTCCATCATCATCATCTCGTTTCGGTTCCTCCTTTCTCTTTTTTGTTTTCGTTTCTGT
1-84 GM HM Allel 1	(601)	
1-45 Gm Gm Allel 1	(601)	ACTOR CANAGET COCCCACO ACTOR TO CACO AND TAKEN AND AND TO CALL THE ATTOR TO CALL AND THE
18 Gm Hm Allel 1	(601)	ACTOL CARAACTICCCCCCCC CTICT GET IT CACCCAGT ICAA ICA ICA ICAET TOET IT CTICTICT IT IT IT TIT TIT TIT TIT T
Inra 777 Hm Allel 1	(601)	acter caaaacticccccccaca cicticteest ticacceest caatca icagi ticest itcisticticcitit titte stittigi tittest tittest
Inra 777 Gm Allel 1	(601)	acto <mark>t caaaacticoccaoda ctoticiggi ticacocagi icaatca icagi tiogi ticigi tototicoti ti titi ti gi ti tigi ti tigi titotigi</mark>
1-84 Gm Gm Allel 2	(594)	acto <mark>c</mark> caaaacttcoccacc <mark>t</mark> ctcttctggtttcacccagttcaatcagttcgtttcgtt
1-30 Gm Gm Allel 2	(594)	acte <mark>c</mark> caa aactic coccace <mark>t</mark> ct ctt ct ggt tt cacce agtic aa tea tea gt tt cg tt ct te tt ct tt tt tt - gt tt tt ggt tt trg t tt te gt tt te gt tt trg tt tt cf gt
18 Gm Gm Allel 2	(593)	acte <mark>c</mark> caaaacticcccacct <mark>ctctictggtttcacccagttcaatcagtticgtttctgttcttcttttttt=gtttttgtttttgttttctgt</mark>
Inra 777 Gm Allel 2	(593)	acteccaaaactecceacotecteteteteteteteteaceeagtecaateateateatetetetettettettettettettette
Inra 777 Hm Allel 2	(593)	acto <mark>c caaaacticcccacct cicit cigit it cacccast icaatca icast it celt it cigit citit citit it it is it it is it is it it is it it is it it is it</mark>
		701 800
1-84 Gm Gm Allel 1	(701)	TTCTGCTTTTGGTGTTTTTGATTGGTTTCTAAGCTTCTGATCATGAATCCACGTCTGTAGGACTGTGATATGAACTACACAATCCTCCTGCGTCGGTTTC
1-84 Gm Hm Allel 1	(701)	TTCTGCTTTTGGTGTTTTTGATTGETTCTAAGCTTCTGATCATGAATCCACGTCTGTAGGACTGTGATATGAACTACACAATCCTCCTGCGTCGGTTTC
1-30 Gm Gm Allel 1	(701)	T TE TE CTT TINGTETT TT TEA TIGST TI CTARSETTET ER TEATE CACETE TE TREGACIE TEATA TA TEAACTACAAAT CET CE TE CET
1-45 Gm Gm Allel 1	(701)	THE IGENT HIGHT THEAT IGENTIC TARGETTIC FARLER A TAGAT CALOR TO FIGURA GARGAT GIRATA TGARCTACACAAT CONCOUNDS TH
IS GM HM AILEI I	(701)	I TO TGOTI I I GOTO I TTURA I GOTI I TURA GOTI CI GALICA I GARI CARGA DI GIRAGA DA GARO I A ACARI COTO I GOGI GOTI I C
Inra 777 Cm Allel 1	(701)	
1-94 Cm Cm Milel 2	(602)	
1-30 Gm Gm Allel 2	(693)	TO TROTT TROTT TT TRATT TO TABLE TO TRATCA TRATCA TRATCA TRADUCTOR A REAL TRADA TA TRADE TA CARA A TOTTO CONCERNOR AND TA TRADA TRADA TA TRADA
18 Gm Gm Allel 2	(692)	TIC TEGETTI TIGETETTI TEA TIGETTI CTA AGETTICTEATCA TEATOCACETICTEAGAC TETEATA TEAACTACACAATCOTOCTOCGETTIC
Inra 777 Gm Allel 2	(692)	TIC TIGGETTI TIGGET GITT TI TIGA TI GET TICTA AGCTTICTIGATICA TGAATICCACGITCITGTA GGACITETGA TA TGAACITACACAATICCTICCTGCGT CGGTTITC
Inra 777 Hm Allel 2	(692)	TTCTGCTTTTGGTGTTTTTGATTGGTTTCTAAGCTTCTGATCATGAATOCACGTCTGTAGGACTGTGATATGAACTACAACAATOCTCCTGCGTOGGTTTC
		801 900
1-84 Gm Gm Allel 1	(801)	TTCTCCCCCCCAGTCCTTCTCGTGATGATGATTCTTTACTGGTTCTACACGTTTTCAGTATTGTGATTTGTTTCGTTTCGTTTGTTT
1-84 Gm Hm Allel 1	(801)	T T C T C C C C C C AGT C C T C T G T T T T T ACT OG T I C T A C A C S T T T C AGT ATT GT GAT T G T T C G T T C G T T C G T C G T C G T C G T A C A C T C G
1-30 Gm Gm Allel 1	(801)	TTCTCCTCCAGTCCTTCTCTGTGATGTTTCTTTACTGGTTCTACACGTTTTCAGTATTGTGATTTGTTTCGTTTCGTTCG
1-45 Gm Gm Allel 1	(801)	TTCTCCTCCAGTCCTTCTCTGTGATGTTTCTTACTGGTTCTACACGTTTTCAGTATTGTGATTGTTTCGTTCG
18 Gm Hm Allel 1	(801)	TTCTCCTCCAGTCCTTCTCTGTGATGTTTCTTACTGGTTCTACACGTTTTCAGTATTGTGATTTGTTTCGTTTCGTTTCGTTTCGTTCG
Inra 777 Hm Allel 1	(801)	TTCTCCTCCAGTCCTTCTCTGTGATGTTTCTTTACTGGTTCTACACGTTTTCAGTATTGTGATTTGTTTCGTTTCGTTTCGTTCG
Inra 777 Gm Allel 1	(801)	TTCTCCTCCAGTCCTTCTCTGTGATGTTTCTTACTGGTTCTACACGTTTTCAGTATTGTGATTTGTTTCGTTTCGTTTCGTTCG
1-84 Gm Gm Allel 2	(793)	TTO TO CALL AND THE TO THE THE THE AND AND THE AND AND THE AND AND THE AND
1-30 Gm Gm Allel 2	(793)	The television of the
To GM GM AIIEL 2	(792)	
Inra 777 Hm Allel 2	(792)	TICICCICCAGICCITCICIGIGAIGTITCITIACIGGICIACAGITITCAGIATIGICATITCITTCCTTTCATITCITCCTTTCATCCTTA
		901
1-84 Cm Cm 211a1 1	(901)	1000 CT3 & & COCCCCT TTTC: TTC: ATTC: ACC ATTCTC: & & CATTC: C2 & & A TCTCCTCTCCCA & TACCCA & COCCACCTTC: & A CACCA
1-84 Gm Hm Allel 1	(901)	CTALA COORDENT TO TRAIN TRADUCT ALL AND THE ALL AND THE CONTENT AND AND ADDRESS AND ADDR
1-30 Gm Gm Allel 1	(901)	CTARACCCCCCCTTT GATIGAT CTGAGAT CTGAAACATTGAGAAA TGTGSTCTGCGAAT AGGA ACGATGGA AGGATGA A GAGATGA AGGATGA
1-45 Gm Gm Allel 1	(901)	CTAAACGCGGCGTTTT GA TIGAT CTGAGATT CTGAAGATT GA GAAAA TGTCGTC TGC GCAATAC GGA AGGCC AGGTT TGAAA GAGATA ATT CA CONTROL
18 Gm Hm Allel 1	(901)	CTA A A CECECET TTE A TEATERA AND A TTE A A CATTER A A A TETES TO TECECATA CEA AGOSCAGET TEA A GAS A ACTO COSTES
Inra 777 Hm Allel 1	(901)	CTAAACGCGCCGTTTTGATTGATCGAGATTCTGAAACATTGAGAAAATGTCGTCTGCGCAATACGGAAGCGCAGGGTTGAAAGAG <mark>-</mark> AACTCACCGTGCG
Inra 777 Gm Allel 1	(901)	CTAAACGCGCGTTTTGATCTGAGATTCTGAGATTCTGAAACATTGAGAAAATGTCGTCTGCGCAATACGGAAGCGCAGGGTTGAAAGAG <mark>-</mark> AACTCACCGTGCG
1-84 Gm Gm Allel 2	(893)	CTAAACGCGGCGTTTTGATTGATCTGAGATTCTGAAACATTGAGAAAATGTCGTCTGCGCAATACGGAAGCGCAGGGTTGAAAGAG <mark>G</mark> AACTCACCGTGGG
1-30 Gm Gm Allel 2	(893)	<mark>CTARAC GCGCGTTTTGATTGATCTGAGATTCTGARACATTGAGARAATGTCGTCTGCGCRATACGGRAGCGCAGGGTTGARAGAG</mark> G <mark>ARCTCRCOGTGOG</mark>
18 Gm Gm Allel 2	(892)	CTARAC GCGCGTTTTGA TTGAT CTGAGATTCTGRARCATTGAGARAR TGTCGTCTGCGCRATAC GGRAGCGCAGGGTTGARAGAG-ARCTCRC0GTGOG
Inra 777 Gm Allel 2	(892)	CTRACCCCCCCTTTTGATTGATCTGAGATTCTGAGAACATTGAGAAAATGTCGTCTGCCCAATACCGAAGCGCAGGGTTGAAAGAG-AACTCACCGTGCG
inra 777 Hm Allel 2	(892)	UTAARUGUGGUGTTTTGATTGATUTGAGATTUTGAGAACATTGAGAAAATGTUGTUTGUGUAATACGGARGOGCAGGGTTGAARGAG-AACTCACCGTGOG
1-94 Cm Cm 211-1 1	(1001)	1001 103/ Checepterter and checepter content of the
1-84 Gm Um Allei 1	(1001)	CA COCCETTOITOLOLA CAACATOTICTICOTO
1-30 Gm Gm 211a1 1	(1001)	
1-45 Gm Gm Allel 1	(1001)	GA GC GC TT CAT GA GAA CA AGET CAT A GC TGT TT CCTG
18 Gm Hm Allel 1	(1000)	GAGCCGTTGATGAGAAGGTCATAGCTGTTTCCTG
Inra 777 Hm Allel 1	(1000)	GAGCOGTTGAT GAGAAGGTCATAGCTGTTTCCTG
Inra 777 Gm Allel 1	(1000)	CAGCOST CATGAGAAGAAGC TCATAGCTGT TT CCTG
1-84 Gm Gm Allel 2	(993)	GAGCGGTTGATGAGAAGAAGGTCATAGCTGTTTCCTG
1-30 Gm Gm Allel 2	(993)	GAGCGGTTGATGAGAAGAAGGTCATAGCTGTTCCTG
19 Cm Cm 311a1 2		
10 GW GW MITEL 7	(991)	GAGCGGTTGATGAGAAGAAGGTCATAGCTGTTTCCTG
Inra 777 Gm Allel 2	(991) (991)	GAGCGGTTGATGAGAAGAAGGTCATAGCTGTTTCCTG GAGCGGTTGATGAGAAGAAGGTCATAGCTGTTTCCTG



9.6 Sequenzen für das Kandidatengen LATERAL SUPPRESSOR

XXXVI

		701 800			
1-84 Gm Gm Allel 1	(684)	A A A T C A T T T T T A A A AT T A A A A			
1-84 Gm Hm Allel 1	(692)	A A A T C A T T T T T A A A ATT A A A AA T GA T A T			
M242 Hm Allel 1	(686)	A A A T C A T T T T T A A A ATT A A A AA T T A A A T GA T A T			
1-30 Gm Gm Allel 1	(687)	A A A T CA T TT TTA AA TTA AAAAT TA AAAATGA TA TA TA TCCCCCATA TTA TTA TGACCTGGGAAGCT TTCCTCCTTCCTTAT CTC TTCCAGGGTCCAG			
1-45 Gm Gm Allel 1	(687)	A A A T C A T T T T T A A A ATT A A A AA T GA A A T GA T A T			
1-84 Gm Gm Allel 2	(692)	A A A T C A T T T T T A A A AT T A A A A			
1-84 Gm Hm Allel 2	(692)	A A A T C A T T T T T A A A AT T A A A A			
M242 Hm Allel 2	(689)	A A A T C A T T T T T A A A AT T A A A A			
1-45 Gm Gm Allel 2	(693)	A A A T C A T T T T T A A A AT T A A A A			
18 Gm Gm Allel 2	(692)	AAATCATTITTAAATTAAAAATTAAAA <mark>T</mark> ITAAAATGATATATCCCCATATTATTATGACCTGGGAAGCTTTCCTCCTTCCT			
801 900					
1-84 Gm Gm Allel 1	(784)	a of to congo ton this coocconting garge of orget can ge go go go to to gar to gat the construction and to a to			
1-84 Gm Hm Allel 1	(792)	A CITIC CAGCINA TA TCACCONA TA GGA GOTOSTGONA GIONACITACIGTI TO GATI TO TGA GATIGAA CONACINACINA A TGA TOO			
M242 Hm Allel 1	(786)	A CITIC CAGCING TA TCACCONA TA GGA GO TOSTGONA GTOACGT GOGTT TOGTA TOGGT TTOTGA GA TOA TONCONACT GTGA AA ACT AA TOA TON			
1-30 Gm Gm Allel 1	(787)	a of the charge team taken concart aggar get one grad get get the get at cograd the grad and concept to the grad and that the team of the second team of the team of the second team of team o			
1-45 Gm Gm Allel 1	(787)	A CITIC CAGCINA TA TOACCONA TA GGA GO TOGIGOCA GIOAC GIOGOTITO GIA TOGGI TI OIGA GAIGAA COAATOCONOCIGI GAAAACIAA TGA TOO			
1-84 Gm Gm Allel 2	(792)	A CITIC CAGCING TA TOACCON TAGGAGO TOGTGOCAGT CACGIGOGTIT TOGTA TOGGIT TI OTGAGATGAA COAAT COCACCIGIGAAAACIAA TGA TOG			
1-84 Gm Hm Allel 2	(792)	A CITIC CAGE TCA TA TCACCCCA TA GGA GO TOG TGOCA GT CAC GT GOGTT TO GTA TO GGT TT OTGA GA TGA TOCCACCTG TGA AA ACT AA TGA TOC			
M242 Hm Allel 2	(789)	A CTTCCA GCTCA TA TCACCCCA TA GGA GCTCGTGCCA GTCACGTGCGTTTCGTA TCGGTTTCTGA GA TGA TCCCACCTGTGA A A CTAA TGA TCC			
1-45 Gm Gm Allel 2	(793)	A CTTCC A GCTCA TA TCA CCCCA TA GGA GCTCG TGCCA GTCACGT GCGTT TCGTA TCGGTTTCTG AG ATGA TCACCCACCTG TGA AA ACTAA TGA TCC			
18 Gm Gm Allel 2	(792)	A CITIC CAGCICA TA TCACCOCA TAGGAGCICGIGCCAGICACGIGCGITITC GIA TCGGITITCIGAGAIGAA CCAATCOCACCIGIGA AAACIAA IGA TCC			
		901 1000			
1-84 Gm Gm Allel 1	(884)	a a too of getigt titing a ticts of a gagatiga agaga gacotoc tagaciget to tog sog as goog cosos of so <mark>c soc os</mark> ca a agetig aagas g			
1-84 Gm Hm Allel 1	(892)	a a to cot get get te tea te ctgo ce aga ga ega ga ga ga cato cta ca caget te tog gege gege cog cos cos cos <mark>de cos c</mark> a a aget ga aga ge			
M242 Hm Allel 1	(886)	a a to cot get get te tea te ctgo ce aga ga tea aga ga cacce ctace ac get te tegge ga gege ce ce ce ce ce ce ca age te aaga ge			
1-30 Gm Gm Allel 1	(887)	A A T C C C T GS TGT TT TGA TT CTG CG AGA GA GA GA GA GA GA C CT CC TAG AC GGT TG TGG GG GAG GG CGG CGG CGG CG GC GG CG GA A GG TG AAG AGG			
1-45 Gm Gm Allel 1	(887)	a a to cot get get te tea te ctgo ce aga ga ga ga ga ga ga cot cot ag ac oget te tog gege gege cog cog cos goes de aget ga age se			
1-84 Gm Gm Allel 2	(892)	A A T C C C T GS TGT TT TGA TT CTG CG AGA GA GA GA GA GA GA C CT CC TAG AC GGT TG TGG GG GG GG GG CG GC GG CG GC GGCAA AG TG AAG AG A			
1-84 Gm Hm Allel 2	(892)	AATCCCTGSTGTTTTGATTCTGCGAGAGAGAGAGAGAGAGACCTCCTAGACGGTTGTGGGGGGGG			
M242 Hm Allel 2	(889)	AATCCCTGGTGTTTTGATTCTGCGAGAGAGAGAGAGAGAG			
1-45 Gm Gm Allel 2	(893)	AATCCCTGGTGTTTTGATTCTGCGAGAGAGAGAGAGAGAG			
18 Gm Gm Allel 2	(892)	A A T C C C T G S T T T T G A T C T G C G A G A G A G A G A G A G A G A C C T C C T A G A C G S T T G T G G G G G G G G G G G G G G			
1001 1026					
1-84 Gm Gm Allel 1	(984)	STCGTCTGGTCATAGCTGTTTCCTG			
1-84 Gm Hm Allel 1	(983) 0	GTCGTCTGGTCATAGCTGTTTCCTG			
M242 Hm Allel 1	(986) <mark>0</mark>	GTCSTCTSGTCATAGCTSTTCCTS			
1-30 Gm Gm Allel 1	(987)	GICGICIGGICATAGCIGITICCIG			

1-30 Gm Gm Allel 1	(987)	GGTCGTCTGGTCATAGCTGTTTCCTG
1-45 Gm Gm Allel 1	(987)	GGTCGTCTGGTCATAGCTGTTTCCTG
1-84 Gm Gm Allel 2	(986)	GGTCGTCTGGTCATAGCTGTTTCCTG
1-84 Gm Hm Allel 2	(986)	GGTCGTCTGGTCATAGCTGTTTCCTG
M242 Hm Allel 2	(983)	GGTCGTCTGGTCATAGCTGTTTCCTG
1-45 Gm Gm Allel 2	(987)	GGTCGTCTGGTCATAGCTGTTTCCTG
18 Gm Gm Allel 2	(986)	GGTCGTCTGGTCATAGCTGTTTCCTG

.....

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

XXXIX

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.